

ความสามารถของฟิลแลนทินในการซึมผ่านเซลล์คาโค-2

นางสาววิลาสิณี ดุนโคกสูง



ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5376582133

PERMEABILITY OF PHYLLANTHIN ACROSS CACO-2 CELLS

Miss Wilasinee Dunkoksung

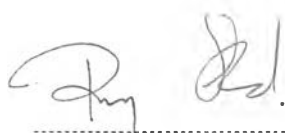


A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology  
Department of Pharmacology and Physiology  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2013  
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	PERMEABILITY OF PHYLLANTHIN ACROSS CACO-2 CELLS
By	Miss Wilasinee Dunkoksung
Field of Study	Pharmacology
Thesis Advisor	Assistant Professor Suree Jianmongkol, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.

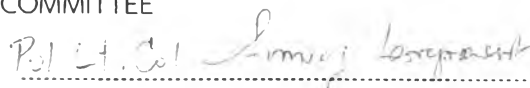
---

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




..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences  
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

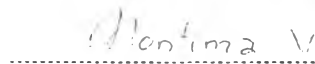
THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Police Lieutenant Colonel Somsong Lawanprasert, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Suree Jianmongkol, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

..... Examiner

(Assistant Professor Rataya Luechapudiporn, Ph.D.)

..... External Examiner

(Sasitorn Aueviriyavit, Ph.D.)

วิลาสิณี ดุนโคกสูง : ความสามารถของฟิลแลนทินในการซึมผ่านเซลล์คาโค-2. (PERMEABILITY OF PHYLLANTHIN ACROSS CACO-2 CELLS) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ญ. ดร.สุรีย์ เจียรณมงคล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ญ. ดร.นนทิมา วรรณระภูติ, 81 หน้า.

ฟิลแลนทินจัดเป็นสารในกลุ่มลิกแนนซึ่งมีความเหมาะสมที่จะถูกนำมาพัฒนาต่อเป็นยา รับประทานเนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ปัจจัยสำคัญที่จะต้องคำนึงถึงสำหรับการ บริหารยาโดยการรับประทานคือชีวประสิทธิผลของตัวยาและโอกาสในการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง ยาที่เกี่ยวข้องกับตัวขนส่งสารออกจากเซลล์ เช่น พี-ไกลโคโปรตีน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความสามารถของฟิลแลนทินในการซึมผ่านเซลล์คาโค-2 ภายใต้การควบคุม pH ให้ คล้ายคลึงกับสภาวะจริงที่เกิดขึ้นในบริเวณทางเดินอาหารส่วนลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังได้ศึกษา ความสามารถในการละลายน้ำของฟิลแลนทินที่ pH ต่างๆ และศึกษาถึงผลของพี-ไกลโคโปรตีน ต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ของฟิลแลนทิน เพื่อประเมินโอกาสในการ เกิดอันตรกิริยาระหว่างยากับยาและยากับอาหารอีกด้วย จากผลการศึกษาพบว่าฟิลแลนทินจัดอยู่ ในกลุ่มของสารที่มีความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ได้ดีมาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านเซลล์ จากด้าน apical (AP) ไปยังด้าน basolateral (BL) เท่ากับ  $34.90 \pm 1.18 \times 10^{-6}$  เซนติเมตรต่อ วินาที ฟิลแลนทินมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำมากหรือไม่ละลายน้ำเลย (มีค่าการละลาย น้อยกว่า 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วง pH 1.0–7.5) ดังนั้นผลจากการประเมินพารามิเตอร์ทั้ง 2 ชนิดบ่งชี้ว่าฟิลแลนทินควรจัดอยู่ในกลุ่ม Biopharmaceutics Classification System (BCS) กลุ่มที่ 2 (คือมีความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ได้ดีมากและมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ) นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วนสัมประสิทธิ์การซึมผ่านเซลล์ด้าน BL-AP ต่อด้าน AP-BL หรือค่า efflux ratio ของฟิลแลนทินมีค่าใกล้เคียง 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพี-ไกลโคโปรตีนไม่มีผล เปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ของฟิลแลนทิน จากการตรวจวัดค่า transepithelial electrical resistance (TEER) ในระหว่างการทดลองพบว่าฟิลแลนทินไม่มีผล เหนี่ยวนำให้เกิดการเปิดของ tight junction ซึ่งเป็นตัวกั้นไม่ให้สารซึมผ่านเซลล์โดยกระบวนการ paracellular transport จากผลโดยรวมแสดงให้เห็นว่ากระบวนการซึมผ่านเซลล์แบบ transcellular transport ควรเป็นกระบวนการหลักในการซึมผ่านเซลล์ของฟิลแลนทิน โดยสรุป แล้วฟิลแลนทินมีความเหมาะสมที่จะถูกนำไปพัฒนาเป็นยารับประทาน สารนี้น่าจะถูกดูดซึมผ่าน ลำไส้ได้ดี โดยไม่มีการขัดขวางการดูดซึมจากพี-ไกลโคโปรตีนและเนื่องจากไม่พบว่าพี-ไกลโค โปรตีนมีผลต่อการดูดซึมของฟิลแลนทินถึงแม้ในการศึกษานี้จะใช้ฟิลแลนทินในความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นสารที่เป็นยับยั้งของพี-ไกลโคโปรตีนน่าจะไม่มีผลรบกวนการดูดซึมของฟิลแลนทิน อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์เพื่อประเมินสัดส่วนการดูดซึม รวมทั้งชีวประสิทธิผลของฟิลแลนทินที่เกิดขึ้นในกายเพื่อการพัฒนาต่อไป

ภาควิชา เภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต วิลาสิณี ดุนโคกสูง

สาขาวิชา เภสัชวิทยา

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.สุรีย์

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.นนทิมา

# # 5376582133 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: PHYLLANTHIN / CACO-2 CELLS / PERMEABILITY / BIOPHARMACEUTICS

CLASSIFICATION SYSTEM (BCS) / P-GLYCOPROTEIN

WILASINEE DUNKOKSUNG: PERMEABILITY OF PHYLLANTHIN ACROSS CACO-2 CELLS. ADVISOR: ASST. PROF. SUREE JIANMONGKOL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D., 81 pp.

Phyllanthin is an active lignan, which has been demonstrated a broad spectrum of pharmacological activities. Phyllanthin is a potential candidate that may be further developed into a new orally administered medicine. The major concerns for oral route of drug administration are drug bioavailability and drug interaction potential involving intestinal efflux transporters including P-glycoprotein (P-gp). This study was aimed to determine the permeability of phyllanthin across the Caco-2 monolayers under the pH gradient condition mimicking the condition in the small intestine. The aqueous solubility of phyllanthin at various pH values was also determined. The influence of P-gp drug efflux pump on phyllanthin permeability was also evaluated to assess its drug-drug and drug-food interaction potential. The results indicated that phyllanthin could be classified as a high permeable compound with an apparent permeability ( $P_{app,AP-BL}$ ) value of  $34.90 \pm 1.18 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ . Phyllanthin was a practically insoluble or an insoluble compound with the aqueous solubility of less than 5  $\mu\text{g/ml}$  over the pH range of 1.0-7.5. According to the biopharmaceutics classification system (BCS), phyllanthin might be classified as a BCS class II (low solubility-high permeability) compound. The efflux ratio of phyllanthin was close to unity, suggesting that P-gp had no influence on phyllanthin transport across Caco-2 monolayers. According to the transepithelial electrical resistance (TEER) monitored during the experiment, phyllanthin did not induce opening of the tight junction, which is the restrictive barrier of the paracellular transport pathway. The overall results suggested that the major transport pathway of phyllanthin was most likely to be the transcellular pathway. In view of its permeability across Caco-2 monolayers, phyllanthin should be feasible to be developed into an oral drug. Phyllanthin would be rapidly absorbed in the intestine with little hindrance from P-gp. Influence of P-gp on phyllanthin was not evident even at a relatively low concentration used in the study. Thus, compounds that are P-gp substrates should not interfere with phyllanthin absorption. Further pharmacokinetic studies should be carried out in order to evaluate its in vivo absorptive fraction and bioavailability for further drug development.

Department: Pharmacology and  
Physiology

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2013

Student's Signature Wilasinee Dunkoksung

Advisor's Signature Suree Jianmongkol

Co-Advisor's Signature Nontima Vardhanabhuti

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere appreciation to my advisor, Assistant Professor Suree Jianmongkol, Ph.D. for her scientific guidance, kindness, encouragement, and understanding throughout this study.

I would also like to express thank Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D., my co-advisor, for her guidance, support, and kindness.

I would also like to thank the thesis committee for their valuable suggestions, comments, and helpful discussion.

I am also grateful to Assistant Professor Bodin Tuesuwan, Ph.D., and Vorasit Vongsutilers, Ph. D., for their suggestions on HPLC analysis techniques.

I am thankful to all my friends in the Department of Pharmacology and Physiology for their friendship and helpful.

Special thanks are extended to the support and research grants from The 90th Anniversary of Chulalongkorn University fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

Above all, I would like to express my deepest gratitude to my family for their encouragement, care, love, and support given to me throughout my life.



## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLES .....	viii
LIST OF FIGURES .....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS .....	xi
CHAPTER I INTRODUCTION .....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW .....	6
I <i>Phyllanthus amarus</i> and phyllanthin .....	6
II Intestinal absorption .....	10
III Drug transport in the gastrointestinal tract .....	13
IV The biopharmaceutics classification system (BCS) .....	16
V The investigate drug-drug interaction in candidate drug selection process ...	18
VI The Caco-2 cells as the model for intestinal absorption .....	20
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS .....	22
CHAPTER IV RESULTS .....	36
CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION .....	54
REFERENCES .....	64
APPENDIX .....	76
VITA .....	81



## LIST OF TABLES

Table	Page
<b>Table 1.</b> Solubility definitions .....	12
<b>Table 2.</b> The absorption rate control step for immediate release (IR) solid oral products based on the BCS class.....	18
<b>Table 3.</b> Regression parameters of the calibration curves of theophylline, antipyrine, furosemide, and phyllanthin.....	39
<b>Table 4.</b> Accuracy and precision data (intra-run and inter-run) of chromatographic method for analysis of theophylline, antipyrine, furosemide, and phyllanthin in transport buffer (pH 7.4).....	41
<b>Table 5.</b> Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of chromatographic method for analysis of theophylline, antipyrine, furosemide, and phyllanthin in transport buffer (pH 7.4).....	42
<b>Table 6.</b> Permeability of phyllanthin, theophylline, antipyrine, and furosemide across the Caco-2 cell monolayers.....	49
<b>Table 7.</b> TEER values at before and after transport experiments.....	51
<b>Table 8.</b> The aqueous solubility of phyllanthin in aqueous media at various pH .....	53



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
Figure 1. <i>Phyllanthus amarus</i> Schum. et Thonn .....	8
Figure 2. Chemical structure of phyllanthin.....	10
Figure 3. Various stages in the intestinal absorption.....	11
Figure 4. Transport processes for drugs and chemicals across in the intestinal cells.	15
Figure 5. The biopharmaceutics classification system (BCS).....	16
Figure 6. Apical and basolateral membrane transporters and metabolizing enzymes localized in Caco-2 cell monolayers.....	21
Figure 7. Relationship between the oral fraction absorbed in humans and apparent permeability coefficients obtained in Caco-2 cell monolayers at two different pH conditions.....	21
Figure 8. The morphology of the Caco-2 cells (left) and VBL-Caco-2 cells (right).....	25
Figure 9. Representative of HPLC chromatograms of test compounds in the cocktail mixture: theophylline (1), antipyrine (2), furosemide (3), and phyllanthin (4).....	37
Figure 10. Representative of HPLC chromatograms of 0.5% DMSO in transport buffer. .....	37
Figure 11. Effect of phyllanthin on cell viability .....	43
Figure 12. Intracellular accumulation of calcein in the VBL-resistant Caco-2 monolayers at the high passage number (96-112).....	44
Figure 13. Intracellular accumulation of calcein in the Caco-2 monolayers at the low passage number (51-56) and VBL-resistant Caco-2 monolayers at the high passage number (96-112).....	45

<b>Figure 14.</b> The TEER values of Caco-2 monolayers (passages number 60-64) during the period of day 5 to day 21 post seeding.....	46
<b>Figure 15.</b> Apparent permeability coefficients (P <sub>app</sub> ) of rhodamine 123 (Rho123) across the Caco-2 monolayers in the absence and presence of verapamil (VER) .....	48
<b>Figure 16.</b> Permeability of rhodamine 123 and phyllanthin across the Caco-2 cell monolayers from the apical-to-basolateral (AP-to-BL) direction and the basolateral-to-apical (BL-to-AP) direction. ....	50
<b>Figure 17.</b> Stability of phyllanthin in HBSS at pH 4.5, 6.5, and 7.4.....	52
<b>Figure 18.1-18.3.</b> Calibration curves of theophylline, antipyrine, furosemide, and phyllanthin in basolateral buffer.....	77
<b>Figure 19.</b> The accumulation of rhodamine 123 across the Caco-2 cell monolayers in both the apical-to-basolateral (AP-to-BL) direction and the basolateral-to-apical (BL-to-AP) direction in the presence and absence of verapamil.....	80



## LIST OF ABBREVIATIONS

ABC	= adenosine triphosphate binding cassette
ANOVA	= analysis of variance
AP	= apical
ATP	= adenosine triphosphate
BCRP	= breast cancer resistance protein
BCS	= Biopharmaceutics Classification System
BL	= basolateral
°C	= Degree celsius
Caco-2	= human colon adenocarcinoma
CO <sub>2</sub>	= carbon dioxide
CYP	= cytochrome P450
DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	= dimethyl sulfoxide
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	= efflux ratio
ERS	= electrical resistance system
FBS	= Fetal Bovine Serum
HBSS	= Hanks' Balanced Salt solution
HEPES	= 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

HPLC	= High performance liquid chromatography
LOD	= limit of detection
LOQ	= limit of quantification
LY	= lucifer yellow
MCT1	= monocarboxylic acid transporter 1
MTT	= 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MES	= 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid hydrate, 4- morpholineethanesulfonic acid
mg/ml	= milligram per milliliter
min	= minute
ml	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimolar
MRPs	= multidrug resistance-associated proteins
nM	= nanomolar
NCE	= new chemical entity
NEAA	= non-essential amino acids
OATP-B	= organic anion-transporting polypeptide B
OCTN2	= organic cation/carnitine transporter 2
PEPT1	= H <sup>+</sup> /di-tripeptide transporter



Papp	= apparent permeability coefficient
PappAP-BL	= apparent permeability coefficient, apical to basolateral
PappBL-AP	= apparent permeability coefficient, basolateral to apical
P-gp	= P-glycoprotein
Rho123	= rhodamine 123
rpm	= round per minute
SEM	= standard error of means
SLC	= solute carrier
TEER	= Transepithelial electrical resistance
$\mu\text{g/ml}$	= microgram per milliliter
$\mu\text{l}$	= microlitter
$\mu\text{m}$	= micrometer
$\mu\text{M}$	= micromolar
UV	= ultraviolet
v/v	= volume by volume
VER	= verapamil
VLB	= vinblastine

