การตั้งตำรับไคโตซานไมโครสเฟียร์ที่บรรจุด็อกซีซัยคลินโดยใช้กลิเซอริลโมโนโอลิเอต เป็นระบบนำส่งยาเพื่อรักษาโรคปริทันต์อักเสบ

นางสาวขนิษฐา สิงห์หิรัญนุสรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

FORMULATION OF DOXYCYCLINE LOADED CHITOSAN MICROSPHERES IN GLYCERYL MONOOLEATE-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR PERIODONTITIS

Miss Khanittha Singhirunnusorn

A Thesis Submitted Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacy
Department of Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Thesis Title	FORMULATION OF DOXYCYCLINE LOADED CHITOSAN MICROSPHERES IN GLYCERYL MONOOLEATE-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR PERIODONTITIS
By	Miss Khanittha Singhirunnusorn
Field of Study	Pharmaceutics
Thesis Advisor	Associate Professor Suchada Chutimaworapan, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Areerat Laorpaksa, M.Sc. in Pharm.

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

Porntip Nimmanitya ..... Chairman

(Associate Professor Porntip Nimmanitya, M.Sc. in Pharm.)

Suchada Chutimaworapan ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Suchada Chutimaworapan, Ph.D.)

Areerat Laorpaksa ..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Areerat Laorpaksa, M.Sc. in Pharm.)

..... Member

(Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.)

Angkana Tantituvanont ..... Member

(Angkana Tantituvanont, Ph.D.)

ขนิษฐา สิงห์หิรัญนุสรณ์: การตั้งตำรับไคโตซานไมโครสเฟียร์ที่บรรจุด็อกซีซัยคลินโดยใช้กลิเซอริลโมโนโอลิเอตเป็นระบบนำส่งยาเพื่อรักษาโรคปริทันต์อักเสบ. (FORMULATION OF DOXYCYCLINE LOADED CHITOSAN MICROSPHERES IN GLYCERYL MONOOLEATE-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR PERIODONTITIS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุชาดา ชุติมาวรพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ. อารีรัตน์ ลออปักษา, 182 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตั้งตำรับไคโตซานไมโครสเฟียร์ที่บรรจุด็อกซีซัยคลินโดยใช้กลิเซอริลโมโนโอลิเอตเป็นระบบนำส่งยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ โดยสามารถเตรียมไคโตซานไมโครสเฟียร์ได้โดยวิธีการทำอิมัลชันและการเกิดเจลแบบใช้ไอออน ได้ใช้การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์เบห์นเคนเพื่อหาสูตรที่มีความเหมาะสมที่สุด จากผลการทดลองได้เลือกสูตรตำรับที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยด็อกซีซัยคลินไฮเคลต (%) ไคโตซาน (%) และ โซเดียมไตรพอลีฟอสเฟต (เอสทีพีพี) (%) เท่ากับ 75:3:15, 75:4:10 และ 30:3:10 ไมโครสเฟียร์ที่ได้สามารถปลดปล่อยด็อกซีซัยคลินไฮเคลตได้นาน 24 ชั่วโมงและมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตามรากที่สองของเวลาซึ่งบ่งชี้ว่าอัตราการปลดปล่อยถูกควบคุมโดยการแพร่ การศึกษาความคงตัวแบบเร่งที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสและการพล็อตแบบอาร์เรเนียส แสดงให้เห็นว่าไมโครสเฟียร์ที่ประกอบด้วยด็อกซีซัยคลินไฮเคลต (%) ไคโตซาน (%) และเอสทีพีพี (%)เท่ากับ 75:3:15, 75:4:10 และ 30:3:10 มีอายุคุณภาพจากการทำนายเท่ากับ 47.04, 245.65 และ 22,208.38 วัน ตามลำดับ จากการศึกษาได้สร้างแผนภาพระบบไตรภาคซึ่งประกอบด้วยไตรกลิเซอไรด์ กลิเซอริลโมโนโอลิเอตและน้ำขึ้นและศึกษาโครงสร้างของวัฏภาคผลึกเหลวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงพอลาไรส์ จากการพิจารณาความสามารถเกิดผลึกเหลวแบบรีเวอร์สเฮกซาโกนาล จึงได้เลือกสูตรตำรับซึ่งประกอบด้วยไตรกลิเซอไรด์ : กลิเซอริลโมโนโอลิเอต : น้ำเท่ากับ 6:15:79 เป็นระบบนำส่งยา จากการศึกษาการปลดปล่อยยาพบว่าไคโตซานไมโครสเฟียร์ที่บรรจุด็อกซีซัยคลินโดยใช้กลิเซอริลโมโนโอลิเอตเป็นระบบนำส่งยาสามารถปลดปล่อยยาได้นาน 48 ชั่วโมงและเป็นไปตามจลนศาสตร์รากที่สองของเวลา นอกจากนี้ไคโตซานไมโครสเฟียร์ที่บรรจุด็อกซีซัยคลินไฮเคลตโดยใช้กลิเซอริลโมโนโอลิเอตเป็นระบบนำส่งยาสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อในหลอดทดลองต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ในร่องเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

ภาควิชา..... เภสัชกรรม..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา..... เภสัชกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4776554733 : MAJOR PHARMACY
KEY WORD: DOXYCYCLINE / CHITOSAN / STPP / GLYCERYL MONOOLEATE / LIQUID CRYSTALS

KHANITTHA SINGHIRUNNUSORN: FORMULATION OF DOXYCYCLINE LOADED CHITOSAN MICROSPHERES IN GLYCERYL MONOOLEATE-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR PERIODONTITIS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUCHADA CHUTIMAWORAPAN, Ph.D. THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. AREERAT LAORPAKSA, M. Sc. in PHARM 182 pp.

The purposes of this study were to develop chitosan microspheres containing doxycycline hyclate and incorporate into glyceryl monooleate-based drug delivery system for the treatment of periodontal disease. The chitosan microspheres were prepared by using emulsification and ionotropic gelation method. The Box-Behnken experimental design was used as a tool for optimize the formulation. From the result obtained the formulations comprising of doxycycline hyclate load (%), chitosan (%) and sodium tripolyphosphate (STPP) (%) as 75:3:15, 75:4:10 and 30:3:10 were selected. The microspheres could sustain release of doxycycline hyclate over a period of 24 hrs and followed square root of time kinetic which indicated that the rate of release was diffusion controlled. The accelerated stability study at 40, 50, 60 and 70°C and the Arrhenius plot indicated that the predicted shelf-lives of microsphere formulations comprising of doxycycline hyclate load (%), chitosan(%) and STPP (%) of 75:3:15, 75:4:10 and 30:3:10 were 47.04, 245.65 and 22208.38 days, respectively. The ternary phase diagram consisted of triglyceride: glyceryl monooleate: water was constructed and the structure of liquid crystalline phases was investigated by using polarized light microscopy. Regarding the ability to form the reverse hexagonal liquid crystalline phase, the formulation containing triglyceride: glyceryl monooleate: water of 6:15:79 was selected as the drug delivery system. The release study indicated that the chitosan microspheres incorporated in glyceryl monooleate-based drug delivery system could prolong the release of doxycycline hyclate over a period of 48 hr and also followed square root of time kinetic. Additionally, the doxycycline hyclate loaded chitosan microspheres in glyceryl monooleate-based drug delivery system exhibited *in vitro* antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, which was found in the periodontal pockets of patients with periodontitis.

Department.....Pharmacy.....Student's Signature: Khanittha Singhirunnusorn
Field of Study.....Pharmaceutics..... Advisor's Signature: Suchada Chutimaporn
Academic Year...2006.....Co-Advisor's Signature: Areerat Laorpaksa

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would not be successful without the great assistance of several people. I shall forever be in great debts for their helps, supports and advices.

First of all, I would like to express my profound gratitude to my advisor, Associate Professor Suchada Chutimaworapan, Ph.D., for her invaluable advice, guidance and enthusiastic encouragement throughout my research study. Her under standing, kindness and patience are honestly appreciated.

I would like to express deep appreciation and grateful thanks to my co-advisor, Associate Professor Areerat Laorpaksa for her valuable suggestion, kindness and encouragement during the microbiological study.

I would like to express my great gratitude to Associate Professor Porntip Nimmannitya, Chairman of my thesis examination committee, as well as other committee members. I am grateful to Assistance Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D. and Dr. Angkana Tantituvanont, for their kind advice and make this thesis complete.

I am very grateful to Dr. Mukdawan Prakobvaitayakit, for spending her valuable time and suggestion for the statistical program.

My gratitude is given to the 90th Year Anniversary of Chulalongkorn University (Ratchadphiseksomphot Endowment Fund) for partially financial support to my thesis work, Siam Bhaesach Co., Ltd. for doxycycline hyclate contribution, FA Unity Co., Ltd. for STPP accommodation and Cognis Thai Ltd. for their supplying of glyceryl monooleate.

Sincere thanks are also given to all staff members of the Department of Pharmacy and Department of Microbiology for their assistance and great helpful support and other people whose names have not been mentioned here.

Ultimately, I would like to express my sincere and deepest gratitude to my family for their endless love, understanding and encouragement throughout this study.

CONTENTS

LIST OF TABLES

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

LISTS OF ABBREVIATIONS

ANOVA	=	analysis of variance
C.V.	=	coefficient of variation
CC	=	chitosan concentration
CFU	=	colony-forming unit
cps	=	centipoises
°C	=	degree Celsius
DA	=	degree of acetylation
DC	=	doxycycline hyclate concentration
DD	=	degree of deacetylation
DSC	=	differential scanning calorimetry
GCF	=	gingival crevicular fluid
GMO	=	glyceryl monooleate
EVA	=	ethylene vinyl acetate
H_{II}	=	reversed hexagonal phase
HPLC	=	high performance liquid chromatography
hr	=	hour
k_0	=	zero-order release rate constant
k_1	=	first-order release rate constant
kg	=	kilogram
k_H	=	diffusion rate constant
LSD	=	least significant difference
L_α	=	lamellar phase
mg	=	milligram
MIC	=	minimum inhibitory concentration
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
n	=	sample size
nm	=	nanometer
No.	=	number
PLGA	=	poly (lactide/glycolide)

PMN	=	polymorphonuclear
R^2	=	coefficient of determination
rpm	=	revolution per minute
SD	=	standard deviation
SEM	=	scanning electron microscope
SPSS	=	statistical package for the social science
STPPC	=	sodium tripolyphosphate concentration
SEM	=	scanning electron micrscope
µg	=	microgram
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
w/w	=	weight by weight