ปัจจัยที่มีผลต่อการนำส่งเฉพาะที่ของโพรพิลไธโอยูเรซิลจากระบบนิโอโซม

นางวราภรณ์ สุวกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม/เภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-14-3836-2
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FACTORS AFFECTING TOPICAL DELIVERY OF PROPYLTHIOURACIL FROM NIOSOMAL SYSTEMS

Ms. WARAPORN SUWAKUL

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutics
Departments of Pharmacy/Manufacturing Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-3836-2

481773

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

วราภรณ์ สุวกูล: ปัจจัยที่มีผลต่อการนำส่งเฉพาะที่ของโพรพิลไธโอยูเรซิลจากระบบนิโอโซม (FACTORS AFFECTING TOPICAL DELIVERY OF PROPYLTHIOURACIL FROM NIOSOMAL SYSTEMS) อ. ที่ปรึกษา: อ. ดร. นนทิมา วรรธนะภูติ, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. บุญศรี องค์พิพัฒน์กุล 212 หน้า. ISBN 974-14-3836-2

นิโอโซมซึ่งเป็นระบบเวซิเคิลชนิดใหม่เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้แทนลิโพโซมเนื่องจากเป็นระบบที่มีความคงตัวดีกว่าและสิ้นเปลืองน้อยกว่าการใช้ลิโพโซม ในการศึกษานี้ได้เตรียมตำรับของโพรพิลไธโอยูเรซิล (พีทียู) ซึ่งเป็นตัวยาที่ไม่ชอบตัวทำละลาย ที่มีฤทธิ์ด้านการแบ่งเซลล์ในรูปของนิโอโซมเพื่อใช้เป็นยาทาเฉพาะที่สำหรับการรักษาโรคสะเก็ดเงิน การศึกษานี้เน้นถึงผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสูตรตำรับต่อการนำส่งพีทียูจากระบบนิโอโซมที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุประเภทต่างๆซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงโดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของนิโอโซมที่เตรียมขึ้น ได้แก่ ประสิทธิภาพการกักเก็บยา ขนาดและการกระจายขนาด การเปลี่ยนเฟส ความยืดหยุ่นของผนังเวซิเคิล ความคงตัว และการปลดปล่อยตัวยา และได้ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังลูกหมูแรกเกิดของพีทียูจากนิโอโซมบางตำรับที่คัดเลือกมาทำการทดลอง โดยใช้เซลล์สำหรับศึกษาการแพร่แบบฟรานซ์ชนิดดัดแปลง ทั้งนี้ได้ศึกษาถึงผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสูตรตำรับ ได้แก่ สถานะทางอุณหพลศาสตร์ของผนังเวซิเคิล ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ และการเกิดเป็นโครงสร้างแบบเวซิเคิล ที่มีต่อการนำส่งพีทียูผ่านผิวหนัง นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเพื่อหากลไกที่เป็นกลไกเด่นในการซึมผ่านผิวหนังของพีทียูจากนิโอโซม ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่านิโอโซมสามารถเกิดขึ้นได้โดยง่ายจากส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆกับคอเลสเตอรอลหรือออกทาออกซิเอธิลีนไกลคอล-8-ลอเรทเอสเทอร์โดยอาจมีหรือไม่มีสารช่วยเพิ่มความคงตัวในตำรับ ประสิทธิภาพการกักเก็บยาและขนาดของพีทียูนิโอโซมขึ้นกับส่วนประกอบทั้งของเวซิเคิลและของเฟสน้ำ นิโอโซมทุกตำรับที่เตรียมได้มีความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน การปลดปล่อยพีทียูจากตำรับนิโอโซมเกิดขึ้นอย่างช้าๆและเป็นไปตามจลนศาสตร์อันดับที่หนึ่ง ค่าคงที่ของอัตราการปลดปล่อยขึ้นกับการกักเก็บยาและสถานะทางอุณหพลศาสตร์ของผนังเวซิเคิล ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสูตรตำรับทุกชนิดที่ทำการศึกษามีผลต่อการซึมผ่านของพีทียูโดยผลที่พบขึ้นกับส่วนประกอบของนิโอโซม กลไกที่เกี่ยวกับประสิทธิภาพการกักเก็บยาและการแพร่ของตัวยาอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกจากนิโอโซมไม่ใช่กลไกเด่นในการนำส่งพีทียูจากนิโอโซม กลไกที่น่าจะเป็นกลไกเด่นในการนำส่งพีทียูจากนิโอโซมที่ศึกษา คือ การเพิ่มการซึมผ่านที่เกิดจากผลของส่วนประกอบของตำรับและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านยาระหว่างเวซิเคิลกับผิวหนัง ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถที่จะปรับเปลี่ยนการนำส่งพีทียูแบบเฉพาะที่จากนิโอโซมได้โดยการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของนิโอโซม

ภาควิชา	เภสัชกรรม/เภสัชอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อนิสิต.....วราภรณ์.....สุวกูล...
สาขาวิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2548	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4376960433 : MAJOR PHARMACEUTICS
KEYWORD: PROPYLTHIOURACIL / NIOSOMES / FEASIBILITY / CHARACTERIZATION / PERMEATION / MECHANISM

WARAPORN SUWAKUL: FACTORS AFFECTING TOPICAL DELIVERY OF PROPYLTHIOURACIL FROM NIOSOMAL SYSTEMS. THESIS ADVISOR: NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. BOONSRI ONGPIPATTANAKUL, Ph.D. 212 pp.
ISBN 974-14-3836-2

Niosomes, a relatively new class of vesicular dosage forms, are thought to be a good alternative to phospholipids-based liposomes since they are more stable and less costly than liposomes. In this study, Propylthiouracil (PTU), a lyophobic drug with an antiproliferative activity, was formulated into niosomes for topical treatment of psoriasis. The study focused on the effects of formulation factors on topical delivery of PTU from niosomal systems prepared from various classes of non-ionic surfactants. PTU niosomes were prepared by the sonication method that was devoid of organic solvent. Characterization of PTU niosomes regarding entrapment efficiency, size and size distribution, phase transition, bilayer elasticity, stability, and drug release was performed. PTU permeation from some selected niosomal formulations across newborn pig skin was studied using modified Franz diffusion cells. The effects of formulation factors, which included the thermodynamic state of vesicular bilayer, surfactant type, and existence of vesicular structure, on PTU delivery across the skin were investigated. The dominating mechanism of PTU skin permeation from niosomes was also elucidated. The results revealed that niosomes readily formed from various compositions of non-ionic surfactant and either cholesterol or octaoxyethyleneglycol-8-laurate ester, with or without a stabilizer. Entrapment efficiency and vesicle size of PTU niosomes depended on the composition of both the vesicles and the aqueous phase. All niosomal formulations were stable within two months of storage at ambient temperature. The release of PTU from all niosomes studied was retarded and followed the first-order kinetics. The release rate constants depended on drug entrapment as well as thermodynamic state of the bilayer. All formulation factors studied could affect PTU permeation, depending on the niosomal compositions. The mechanisms involving entrapment efficiency and diffusion of free drug that was released from niosomal vesicles were not the dominating mechanisms of PTU delivery from niosomes. On the other hand, penetration-enhancing properties of the vesicular components and the mechanism involving vesicle-skin transfer were likely to be the dominating mechanisms of PTU delivery from niosomal systems studied. The results of this study indicate that topical delivery of PTU from niosomes could be modulated by modification of niosomal formulations.

Department Pharmacy/Manufacturing Pharmacy		Student's signature W. Suwakul
Field of study	Pharmaceutics	Advisor's signature N. Vardhanabhuti
Academic year	2005	Co-advisor's signature Boonsri Ongpipattanakul

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks and gratitude to my advisor, Dr. Nontima Vardhanabhuti, for her invaluable advice, kindness, encouragement, and understanding throughout this study.

I am also profoundly thankful to Assistant Professor Boosri Ongpipattanakul, Ph.D., my co- advisor, for her guidance, kindness, and invaluable advice. I also would like to express my appreciation to Associate Professor Porntip Nimmannitaya, chairman of my thesis examination committee, as well as other committee members for their valuable suggestions and helpful discussion.

A special thank goes to Assistant Professor Vichien Jongbunprasert for his advice and help with the photomicrographs. I am deeply thankful to Associate Professor Ubontip Nimmannit, Ph.D., for the gift of Solulan® C24, to Professor Garnpimol C. Rithdej, Ph.D., for the use of the Mastersizer 2000, to Associate Professor Suchada Chutimaworapan, Ph.D., for the use of DSC 822e, to Stepan Company, USA, for the gift of GDS and PEG-8-L, to Mitsubishi-Kagaku Foods corporation, Japan, for the gift of sucrose laurate (L-595), and EAC Chemical for the gift of Tween®, Span®, and Brij®.

Special thanks are given to the Graduate School, Chulalongkorn University and the Ministry of University Affairs for their granting partial financial support to my thesis work.

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

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

CONTENTS

Page

ABSTRAC [THAI]....iv
ABSTRAC [ENGLISH]....v
ACKNOWLEDGEMENTS....vi
CONTENTS....vii
LIST OF TABLES....x
LIST OF FIGURES....xiii
LIST OF ABBREVIATIONS....xv
CHAPTER
I INTRODUCTION....1
II LITERATURE REVIEW....8
Psoriasis....8
PTU in the Treatment of Psoriasis....8
Niosomes....9
Materials Used in the Preparation of Niosomes....10
Niosomes Preparation Methods....15
Factors Governing Niosome Formation....16
Characterization of Niosomes....21
Factors Influencing Niosomes Characterization....23
Niosomes as a Topical Drug Delivery System....34
Factors Affecting Drug Permeation into/through the Skin....35
Mechanism of Action of the Vesicles....47
In Vitro Permeation Study....53
III MATERIALS AND METHODS....58
Materials....58
Equipment....59
Methods....60

CONTENTS (continued)

Page

Solubility of PTU.....60
Feasibility Study on Preparation of PTU Vesicles by Sonication Method.....60
Characterization of the PTU Vesicular Suspensions.....61
Drug Release Studies.....64
Permeation Studies.....66
Effects of Formulation Factors on Permeation of PTU from Vesicular Suspensions.....69
Elucidation of the Dominating Mechanism of PTU Permeation from Vesicular Suspensions.....71
Statistical Analysis.....72
IV RESULTS AND DISCUSSION.....74
Solubility of PTU.....74
Feasibility of Vesicle Formation by Sonication Method.....75
Characterization of PTU Vesicular Suspensions.....79
Drug Release Studies.....101
Effects of Formulation Factors on Permeation of PTU from Vesicular Suspensions.....106
Elucidation of the Dominating Mechanism of PTU Permeation from Vesicular Suspensions.....124
V CONCLUSIONS.....147
REFERENCES.....150
APPENDICES.....168
APPENDIX A Molecular Structure and Physical Properties of Propylthiouracil (PTU).....169
APPENDIX B Molecular Structure and Physical Properties of Some Selected Materials.....171

CONTENTS (continued)

Page

APPENDIX C Validation of UV Spectroscopic Method.....175
APPENDIX D Validation of HPLC Method.....192
APPENDIX E Photographs of PTU Niosomes.....205
APPENDIX F DSC Thermogram of PTU Niosomes.....209
VITA.....212

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	Solubility data of PTU in different aqueous media	74
2	Compositions of lipid in formulations that formed complete vesicles	76
3	PTU entrapment efficiency prepared from various formulations	81
4	Average size of PTU vesicles prepared from various formulations	82
5	Melting points of pure compounds and surfactant mixtures	91
6	Phase transition temperature of the blank and PTU vesicles in water	92
7	Phase transition temperature of the blank and PTU vesicles in phosphate buffer, pH 7.4	93
8	Entrapment efficiencies of PTU vesicles in water after 2 months of storage at ambient temperature	95
9	Entrapment efficiencies of PTU vesicles in phosphate buffer after 2 months of storage at ambient temperature	96
10	Average sizes of PTU vesicles in water after 2 months of storage at ambient temperature	97
11	Average sizes of PTU vesicles in phosphate buffer after 2 months of storage at ambient temperature	98
12	Phase transition temperatures of PTU vesicles in water after 2 months of storage at ambient temperature	99
13	Phase transition temperatures of PTU vesicles in phosphate after 2 months of storage at ambient temperature	100
14	Release rate constant of various formulations	103
15	Effects of thermodynamic state on permeation parameters of PTU release from PTU vesicles	109
16	Effects of surfactant type on permeation parameters of PTU from PTU niosomes	113
17	Permeation parameters of PTU from saturated solution in water and phosphate buffer pH 7.4	115

LIST OF TABLES (continued)

TABLE		PAGE
18	Codes and compositions of formulations tested	116
19	Permeation parameters of PTU from Span® 20:CHO:Solulan® C24 vesicles and physical mixtures of Span® 20:CHO:Solulan® C24 in PG	120
20	Permeation parameters of PTU from Span® 40:CHO:Solulan® C24 vesicles and physical mixtures of Span® 40:CHO:Solulan® C24 in PG	121
21	Permeation parameters of PTU from GDS:CHO:Brij® 76 vesicles and physical mixtures of GDS:CHO:Brij® 76 in PG	122
22	Permeation parameters of PTU from L-595:PEG-8-L vesicles and physical mixtures of L-595:PEG-8-L in PG	123
23	Pearson correlation coefficients between entrapment efficiency and permeation parameters	126
24	Permeation parameters of PTU from Span® 40:CHO:Solulan® C24 and L-595:PEG-8-L vesicles	127
25	Pearson correlation coefficients between entrapment efficiency and permeation parameters	129
26	Permeation parameters of PTU from PTU solution at 90% saturation after pretreatment with empty vesicles	131
27	p-values from Dunnett test of permeation parameters against control	132
28	Permeation parameters of PTU solution (at 90% saturation) after pretreatment with L-595:PEG-8-L empty vesicles at 100 and 200 mg/mL	134
29	Permeation parameters of PTU from L-595:PEG-8-L vesicles at 100 and 200 mg/mL	135
30	Permeation parameters of PTU from PTU containing vesicles and pretreatment of Span® 20 system	136
31	Permeation parameters of PTU from PTU containing vesicles and pretreatment of Span® 40 system	137

LIST OF TABLES (continued)

TABLE **PAGE**

32 Permeation parameters of PTU from PTU containing vesicles and pretreatment of L-595 system 137

33 Permeation parameters of PTU from PTU containing vesicles and pretreatment of GDS system 138

34 Permeation parameters from L-595 vesicles under non-occlusive and occlusive conditions 140

35 Permeation parameters from Span® 40 vesicles under non-occlusive and occlusive conditions 141

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

1 Schematic description of various mechanism in the skin drug permeation of liposomes.....48

2 Typical permeation profile for a molecule diffusing across the skin.....55

3 A modified Franz diffusion cell.....56

4 Effect of Solulan® C24 on PTU entrapment efficiency in niosomal systems water.....83

5 Effect of Solulan® C24 on PTU entrapment efficiency in niosomal systems in phosphate buffer, pH 7.4 84

6 Effect of Solulan® C24 on the vesicle size of niosomes prepared in water.....86

7 Effect of Solulan® C24 on the vesicle size of niosomes prepared in phosphate buffer, pH 7.4.....86

8 Size distribution of the vesicles prepared from Span® 40 without Solulan® C24 in phosphate buffer syste.....87

9 Size distribution of the vesicles prepared from Span® 60 without Solulan® C24 in phosphate buffer system.....87

10 Size distribution of the vesicles prepared from Span® 40 with Solulan® C24 in phosphate buffer system 88

11 Size distribution of the vesicles prepared from Span® 60 with Solulan® C24 in phosphate buffer system.....88

12 Relationship between entrapment efficiency and size of PTU niosomes in water.....89

13 Relationship between entrapment efficiency and size of PTU niosomes in phosphate buffer, pH 7.4.....89

14 Release profiles of PTU vesicles and saturated solutions 104

15 Permeation profiles of PTU from vesicles in different thermodynamic states.....108

LIST OF FIGURES (continued)

FIGURE **PAGE**

16 Permeation profiles of PTU from GDS:CHO:Brij® 76 45:15:40 w/w and Span® 40:CHO:Solulan® C24 67.5:27.5:5 w/w vesicles.....113

17 Permeation profiles of PTU from aqueous solution (CS) and propylene glycol solution (CPG).....118

18 Permeation profiles of PTU from GDS vesicles and GDS/PG physical mixtures 118

19 Permeation profiles of PTU from Span® 20 vesicles and Span® 20/PG physical mixtures 119

20 Permeation profiles of PTU from Span® 40 vesicles and Span® 40/PG physical mixture 119

21 Permeation profiles of PTU from L-595 vesicles and L-595/PG solution..... 120

22 Permeation profiles of PTU from L-595:PEG-8-L at 100 and 200 mg/mL 135

23 Permeation profiles of PTU from L-595:PEG-8-L vesicles under non-occlusive and occlusive conditions.....140

24 Permeation parameters of PTU from solution (90 % saturation) under non-occlusive and occlusive conditions 141

25 Permeation profiles of PTU from Span® 40 vesicles under non-occlusive and occlusive conditions 142

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	=	analysis of variance
CHO	=	cholesterol
CLSM	=	confocal scanning electron microscopy
cm	=	centimeter
cm^2	=	square centimeter
Conc.	=	concentration
CPP	=	critical packing parameter
CV	=	coefficient of variation
DCP	=	dicetylphosphate
DLPC	=	dilauryl phosphatidylcholine
DMPC	=	dimyristoyl phosphatidylcholine
DOPC	=	dioleoyl phosphatidylcholine
DPPC	=	dipalmitoyl phosphatidylcholine
DSC	=	differential scanning calorimeter
DSPC	=	distearyl phosphatidylcholine
EE	=	entrapment efficiency
EF	=	enhancement factor
EO	=	polyoxyetylene group
EPC	=	egg phosphatidylcholine
et al.	=	et alii, and others
etc	=	et cetera
FFEM	=	freeze fracture electron microscopy
g	=	gram
GDL	=	glyceryl dilaurate
GDS	=	glyceryl distrearate
HLB	=	hydrophile lipophile balance
HPC	=	hydrogenated phosphatidylcholine
HPLC	=	high performance liquid chromatography

LIST OF ABBREVIATIONS (continued)

hr	=	hour
HSPC	=	hydrogenated soya phosphatidylcholine
i. e.	=	id est
L	=	litter
L-595	=	sucrose laurate ester
LDS	=	lipid disperse systems
LUVs	=	large unilamellar vesicles
mg	=	milligram
min	=	minute
mL	=	milliter
MLVs	=	multilamellar vesicles
mm	=	millimeter
MP	=	melting point
MW	=	molecular weight
nm	=	nanometer
°C	=	degree Celsius
PAE	=	polyoxyethylene alkyl ethers
PBS	=	phosphate buffer saline
PC	=	phosphatidylcholine
PEG	=	polyethylene glycol
PEG-8-L	=	octaoxyethyleneglycol-8-laurate
PG	=	propylene glycol
P_s	=	permeability coefficient
PTU	=	propylthiouracil
Q_{24}	=	PTU in PBS at 24 hours
Q_s	=	PTU in skin
R^2	=	coefficient of determination
RF	=	relative flux
rpm	=	revolution per minute

LIST OF ABBREVIATIONS (continued)

SD	=	standard deviation
SEM	=	standard error of mean
SPSS	=	statistical package for the social sciences
SUVs	=	small unilamellar vesicles
TEM	=	transmission electron microscopy
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/w	=	weight by weight
µg	=	microgram
µL	=	microliter
µm	=	micrometer