

การเตรียมและการตรวจสอบลักษณะของเคอคูมินอยด์นาโนพาร์ทิเคิล

จากพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้



นางสาวแพรวพรรณ บุญยศิริศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 947-53-1833-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION
OF BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLES
CONTAINING CURCUMINOIDS**

Miss Praewpun Boonyasirisri

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmaceutical Technology**

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1833-7

Copyright of Chulalongkorn University

แพรวพรรณ นุญชศิริศรี: การเตรียมและการตรวจสอบลักษณะของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล
จากพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้ (PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLES CONTAINING CURCUMINOIDS).

อ. ที่ปรึกษา: ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์, 174 หน้า.
ISBN 974-53-1833-7

ปัจจุบันนี้เทคโนโลยีมีบทบาทอย่างมากในการส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมถึงเทคโนโลยีเกี่ยวกับระบบนำส่งยาเข้าสู่ร่างกายซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสนใจเกี่ยวกับแนวคิดและนวัตกรรมใหม่ในการออกแบบและพัฒนาตัวพาหุที่เป็นนาโนพาร์ทิเคิล มีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากพอลิ(แลคไทด์-โค-ไกลโคลิเด) (พีแอลจีเอ) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้ ส่วนอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล เป็นสารสกัดจากขมิ้นชัน สามารถใช้รักษาแทนยาแผนปัจจุบันได้เนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แต่สารนี้มีข้อจำกัดในการใช้ทางยา เช่น มีชีวิตครึ่งชีวิตสั้น และมีค่าครึ่งชีวิตในระบบไหลเวียนเลือดต่ำ เป็นต้น ดังนั้น ควรใช้ระบบนำส่งยาเข้าสู่ร่างกายที่มีประสิทธิภาพเพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ ในงานวิจัยนี้ได้มีการเตรียมพีแอลจีเอนาโนพาร์ทิเคิลของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล โดยวิธีโมดิฟายด์สอปอนแทนเอนิมัลชันโซลเวนท์คิฟฟิวชัน โดยใช้สารให้ความคงตัว 3 ชนิด ได้แก่ วิตามินอีที่พีจีเอส พอลีออกซาเมอร์ 407 และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยนำบ็อกซ์-เบสันเคนดีไซน์ ซึ่งเป็นวิธีออกแบบและวิเคราะห์ผลการทดลองที่มี 3 ตัวแปรซึ่งแบ่งเป็น 3 ระดับ มาใช้ศึกษาถึงผลของส่วนประกอบต่างๆ ในสูตรตำรับของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล ได้แก่ อัตราส่วนของพอลิแลคไทด์และพอลิไกลโคลิเดในพีแอลจีเอ (50:50 75:25 และ 85:15) ปริมาณอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลในสูตรตำรับ (2% 6% และ 10%) และความเข้มข้นของสารให้ความคงตัว ต่อตัวตอบสนอง 5 ชนิด ได้แก่ ปริมาณของนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้ ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค ปริมาณอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลที่บรรจุอยู่ในนาโนพาร์ทิเคิล และประสิทธิภาพในการบรรจุสารไว้ภายในนาโนพาร์ทิเคิล เพื่อหาส่วนสูตรตำรับที่เหมาะสม สูตรตำรับที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลที่ได้จากการทดลองนี้มี 3 สูตร ประกอบด้วย (1) พีแอลจีเอ 50:50 อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล 10% และ วิตามินอีที่พีจีเอส 3% (2) พีแอลจีเอ 50:50 อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล 4.56% และ พอลีออกซาเมอร์ 407 15% และ (3) พีแอลจีเอ 50:50 อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล 10% และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 3% ซึ่งเมื่อเตรียมเป็นอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล และนำไปประเมินผลโดยใช้ตัวตอบสนอง 5 ชนิด ดังกล่าว พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่คาดการณ์ไว้ นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงรูปร่างลักษณะของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลโดยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีลักษณะเป็นทรงกลมผิวเรียบ และจากการศึกษาการปลดปล่อยอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล พบว่ามีรูปแบบการปลดปล่อยแบบเนิ่นนาน

สาขาวิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรมนานาชาติ
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4576856033: MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (INTERNATIONAL) PROGRAM

KEY WORD: NANOTECHNOLOGY/ NANOPARTICLES/ PLGA/ CURCUMINOIDS/ VITAMIN E TPGS/
MODIFIED-SESD METHOD/ OPTIMIZATION/ BOX-BEHNKEN DESIGN

PRAEWPUN BOONYASIRISRI: PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLES CONTAINING CURCUMINOIDS. THESIS
ADVISOR: PORNCHAI ROJSITTHISAK, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. UBONTHIP
NIMMANNIT, Ph.D. 174 pp. ISBN 974-53-1833-7

In recent years, nanotechnology has provided significant advances of sciences and technology, including drug delivery technology, in which most of research has been attracted by an innovation of nanoparticulate carriers. Biodegradable polymeric nanoparticles prepared from poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) copolymer have been widely investigated. Regarding curcuminoids, which have been used as an alternative therapeutic agent due to their various biological activities, especially antioxidant activity, they also have some limitations of use, e.g. low bioavailability, short circulation half-life, etc. Thus, an effective carrier is required to overcome this problem. In this study, curcuminoids-PLGA nanoparticles were prepared following the modified spontaneous emulsification solvent diffusion (modified-SESD) method, using vitamin E TPGS, poloxamer 407, or polyvinyl alcohol (PVA) as stabilizers. A three-factor, three-level Box-Behnken design was used to determine the effect of formulation ingredients, which were PLA-PGA ratio of PLGA (50:50, 75:25, or 85:15), curcuminoids amount (2, 6, or 10%) and concentration of each stabilizer on five responses of the nanoparticles; %recovery, particle size, size distribution, %curcuminoids content, and entrapment efficiency. From the simultaneous optimization technique, three optimal formulations were established. Each formulation was composed of (1) PLGA 50:50, curcuminoids 10%, and vitamin E TPGS 3%; (2) PLGA 50:50, curcuminoids 4.56%, and poloxamer 407 15% and (3) PLGA 50:50, curcuminoids 10%, and PVA 3%. The optimized formulations were prepared and evaluated on the five responses, which provided the actual values similar to the predicted values. In addition, the morphology study showed that the particles were spherical in shape with smooth surface and no untrapped curcuminoids were observed. The *in vitro* release study of entrapped curcuminoids indicated that the release of curcuminoids was in a sustained manner.

Field of study Pharmaceutical Technology

Academic year 2004

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I am deeply indebted to many people who have made their kind contributions to my research.

Firstly, I would like to express my profound gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Pornchai Rojsitthisak for valuable comments and suggestions, kindness and constant encouragement throughout my study. My sincere appreciation also goes to Associate Professor Dr. Uboonthip Nimmannit, my co-advisor for her helpful and valuable advice. I am very much obliged to the members of my thesis committee for their supportive attitude, constructive criticisms and valuable discussion over my thesis. I would also like to thank all the faculty members in the Pharmaceutical Technology (International) Program for their help and encouragement.

My appreciations also go to Associate Professor Dr. Sunanta Pongsamart and the Department of Manufacturing, Chulalongkorn University for giving me the privilege of using the laboratory equipment for my experiments. I would like to thank the Scientific and Technological Research Equipment Center of Chulalongkorn University for the supply of its useful data to my thesis.

I am most grateful to the Government Pharmaceutical Organization (GPO) for providing the graduate study scholarship. My grateful also go to the Graduate School of Chulalongkorn University and the Pharmaceutical Technology (International) Program, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for giving a grant to conduct my research.

Above all, I would like to express my sincerest and deepest gratitude to my parents and my family for their unconditional love, understanding, moral support and tremendous encouragement throughout my life.

Finally, my deep appreciation goes to my friends and other people, whose names have not been mentioned, for helping me in anyway during the time of my study.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (ENGLISH).....	iv
ABSTRACT (THAI).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEWS.....	8
III MATERIALS AND METHODS.....	40
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	53
V CONCLUSIONS.....	106
REFERENCES.....	109
APPENDICES.....	117
APPENDIX A.....	118
APPENDIX B.....	132
APPENDIX C.....	135
APPENDIX D.....	142
VITA.....	174

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. A three-factor, three-level Box-Behnken design	38
2. The design structure of experimental factors	43
3. Design points of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	44
4. Design points of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	45
5. Design points of curcuminoids-PLGA nanoparticles using polyvinyl alcohol (PVA) as a stabilizer	46
6. Responses of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as stabilizer (Formulation Number 1 to 15)	53
7. The constrained optimization of each factor and response of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as stabilizer	65
8. Responses from of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as stabilizer (Formulation Number 16 to 30)	67
9. The constrained optimization of each factor and response of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as stabilizer	81
10. Responses from of curcuminoids-PLGA nanoparticles using polyvinyl alcohol as stabilizer (Formulation Number 31 to 45)	83
11. The constrained optimization of each factor and response of curcuminoids-PLGA nanoparticles using polyvinyl alcohol (PVA) as stabilizer	96
12. The optimal formulation of curcuminoids-PLGA nanoparticles	97
13. Observed responses of the optimal formulation of curcuminoids-PLGA nanoparticles (Formulation Number 46-48)	97
14. Predicted values from the simultaneous optimization of all responses of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as stabilizer	98
15. Predicted values from the simultaneous optimization of all responses of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as stabilizer	99

TABLE	PAGE
16. Predicted values from the simultaneous optimization of all responses of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as stabilizer	99
17. %Recovery of curcuminoids-PLGA nanoparticles	130
18. Particle size of curcuminoids-PLGA nanoparticles	132
19. Polydispersity index of curcuminoids-PLGA nanoparticles	134
20. Design-Expert® output for fitting a model to the %recovery of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	144
21. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the %recovery of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	145
22. Design-Expert® output for fitting a model to the particle size of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	146
23. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the particle size of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	147
24. Design-Expert® output for fitting a model to the polydispersity index of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	148
25. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the polydispersity index of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	149
26. Design-Expert® output for fitting a model to the %curcuminoids content of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	150
27. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the %curcuminoids content of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	151
28. Design-Expert® output for fitting a model to the entrapment efficiency of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	152
29. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the entrapment efficiency of curcuminoids-PLGA nanoparticles using vitamin E TPGS as a stabilizer	151

TABLE	PAGE
30. Design-Expert® output for fitting a model to the %recovery of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	154
31. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the %recovery of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	155
32. Design-Expert® output for fitting a model to the particle size of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	156
33. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the particle size of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	157
34. Design-Expert® output for fitting a model to the polydispersity index of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	158
35. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the polydispersity index of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	159
36. Design-Expert® output for fitting a model to the %curcuminoids content of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	160
37. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the %curcuminoids content of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	161
38. Design-Expert® output for fitting a model to the entrapment efficiency of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	162
39. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the entrapment efficiency of curcuminoids-PLGA nanoparticles using poloxamer 407 as a stabilizer	163
40. Design-Expert® output for fitting a model to the %recovery of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	165
41. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the %recovery of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	166

TABLE	PAGE
42. Design-Expert® output for fitting a model to the particle size of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	167
43. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the particle size of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	168
44. Design-Expert® output for fitting a model to the polydispersity index of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	169
45. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the polydispersity index of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	149
46. Design-Expert® output for fitting a model to the %curcuminoids content of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	150
47. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the %curcuminoids content of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	151
48. Design-Expert® output for fitting a model to the entrapment efficiency of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	152
49. Design-Expert® output of ANOVA with model reduction of formulation ingredient effect on the entrapment efficiency of curcuminoids-PLGA nanoparticles using PVA as a stabilizer	151

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. Schematic cross-section diagrams illustrating nanoparticles	10
2. Chemical structure of poly (lactic acid) (PLA) and poly (glycolic acid) (PGA)	24
3. Chemical structures of vitamin E and vitamin E TPGS	29
4. Chemical structures of curcuminoids	31
5. Schematic diagram illustrating a Box-Behnken design for three factors and three levels	37
6. Plot of %curcuminoids content against %curcuminoids loaded in the formulation and against vitamin E TPGS concentration	60
7. Contour plot and 3-D plot of the %curcuminoids content versus %curcuminoids loading and vitamin E TPGS concentration	60
8. Plots of the entrapment efficiency of the nanoparticles against %curcuminoids loaded in the formulation	63
9. Plot of particle size against %curcuminoids loaded in the formulation and against poloxamer 407 concentration	71
10. Contour plot (4-5a) and 3-D plot (4-5b) of the particle size versus %curcuminoids loading and poloxamer 407 concentration	71
11. Plot of particle size distribution (polydispersity) against poloxamer 407 concentration	74
12. Plot of %curcuminoids content against %curcuminoids loaded in the formulation and poloxamer 407 concentration	76
13. Contour plot (4-8a) and 3-D plot (4-8b) of the %curcuminoids content versus % curcuminoids loading and poloxamer concentration	76
14. Plot of entrapment efficiency against %curcuminoids loaded in the formulation and against poloxamer 407 concentration	79

FIGURE	PAGE
15. Contour plot and 3-D plot of the particle size versus % curcuminoids loading and poloxamer 407 concentration	79
16. Plot of particle size against %curcuminoids loaded in the formulation and against PVA concentration	
17. Contour plot and 3-D plot of the particle size versus % curcuminoids loading and poloxamer 407 concentration	87
18. Plot of %curcuminoids content against PLA-PGA ratio and against %curcuminoids loaded in the formulation	91
19. Contour plot and 3-D plot of the %curcuminoids content versus PLA-PGA ratio and % curcuminoids loading in the formulation	91
20. Plot of entrapment efficiency against PLA-PGA ratio and against %curcuminoids loaded in the formulation	94
21. Contour plot (4-16a) and 3-D plot (4-16b) of the entrapment efficiency versus PLA-PGA ratio and %curcuminoids loading	94
22. Scanning electron micrograph of curcuminoids-PLGA nanoparticles obtained from the optimal formulation number 46, 47, and 48	100
23. Release patterns of curcuminoids from PLGA nanoparticles obtained from the optimal formulation (Number 46 to 48)	102
24. Calibration curve of curcuminoids	141
25. HPLC-chromatogram of curcuminoids	142

LIST OF ABBREVIATIONS

PLGA	= poly(lactide-co-glycolide)
PLA	= polylactic acid
PGA	= polyglycolic acid
PVA	= polyvinyl alcohol
Vitamin E TPGS	= d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate
nm.	= nanometer
mm	= millimetre
%w/w	= percentage of weight by weight
ml	= millilitre
mg	= milligram
rpm	= round per minute
$^{\circ}\text{C}$	= degree Celsius
μl	= microlitre
μm	= micrometre
min	= minute
hr	= hour