การพัฒนานาโนพาร์ทิเคิลของไขมันแข็งและตัวพาไขมันโครงสร้างระดับนาโน บรรจุแอมโฟเทอริซิน บี

นาย ภาสวีร์ จันทร์สุก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2486-8

DEVELOPMENT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS CONTAINING AMPHOTERICIN B

Mr. Phatsawee Jansook

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy
Department of Manufacturing Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-53-2486-8

Thesis Title	Development of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing Amphotericin B
By	Mr. Phatsawee Jansook
Field of Study	Industrial Pharmacy
Thesis Advisor	Professor Garnpimol C. Ritthidej, 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

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Wichein Thanindratarn, M.Sc. in Pharm.)

.....Thesis Advisor

(Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.)

.....Member

(Professor Narong Sarisuta, Ph.D.)

.....Member

(Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Pornanong Aramwit, Pharm. D., Ph.D.)

ภาสวีร์ จันทร์สุก : การพัฒนานาโนพาร์ทิเคิลของไขมันแข็งและตัวพาไขมันโครงสร้างระดับนาโนบรรจุแอมโฟเทอริซิน บี. (DEVELOPMENT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS CONTAINING AMPHOTERICIN B) อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร. กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, 294 หน้า. ISBN 974-53-2486-8

แอมโฟเทอริซิน บี เป็นยาที่มีประสิทธิภาพต่อการต้านเชื้อราในกระแสเลือด แต่การใช้ฟังจิโซนซึ่งเป็นยาในรูปแบบไมเซล ถูกจำกัดด้วยขนาดการใช้ที่ทำให้เกิดพิษต่อร่างกาย เพื่อลดความเป็นพิษของยาดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบอนุภาคของไขมัน 2 ประเภท คือ นาโนพาร์ทิเคิลของไขมันแข็งและตัวพาไขมันโครงสร้างระดับนาโน ซึ่งเตรียมขึ้นมาจาก กลีเซอรีลบีฮีเนท และ กลีเซอรีลปาลมิโทสเตียเรทด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชันอุณหภูมิสูงและวิธีไมโครอิมัลชัน เพื่อประเมินความคงตัวของอนุภาคทางกายภาพและความคงตัวทางเคมีของยาในสภาวะ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน ตัวพาไขมันโครงสร้างระดับนาโนต่างจากนาโนพาร์ทิเคิลของไขมันแข็งเนื่องจากมีไขมันชนิดเหลวกระจายในเมทริกซ์ของไขมันแข็ง ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคของไขมันที่เตรียมได้สามารถให้ทางหลอดเลือดดำ สูตรตำรับที่เหมาะสมมีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 300 นาโนเมตร มีการกระจายขนาดอนุภาคช่วงเดียว และมีประจุลบที่ผิวของอนุภาค ตัวยาสลายตัวเร็วในสูตรตำรับที่ใช้ ทวีน 80 และ ครีโมฟอร์ อีแอล เป็นสารเพิ่มความคงตัว สูตรตำรับที่ดีที่สุดในการเตรียมโดยวิธีโฮโมจีไนเซชันอุณหภูมิสูง ประกอบด้วย กลีเซอรีลปาลมิโทสเตียเรทร้อยละ 3 และ พอลอกซาเมอร์ 407 ในความเข้มข้นร้อยละ 2 ส่วนในวิธีไมโครอิมัลชัน สูตรตำรับที่ดีที่สุดประกอบด้วย กลีเซอรีลปาลมิโทสเตียเรทร้อยละ 10 ครีโมฟอร์ อาร์เอช 40 และ กลีเซอรีนในความเข้มข้นร้อยละ 20 การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลของไขมันแข็งในรูปแบบผงแห้งไม่ประสบความสำเร็จ อาจเนื่องมาจากความไม่สมบูรณ์ของกระบวนการทำให้แห้ง ประสิทธิภาพของการบรรจุยาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ไขมันชนิดเหลวร่วมด้วยในระบบที่มี พอลอกซาเมอร์ 407 เป็นสารเพิ่มความคงตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้เลซิตินในระบบจะเพิ่มความสามารถในการบรรจุยามากขึ้น ผลของโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ชี้ให้เห็นว่ามีกลุ่มไขมันชนิดเหลวกระจายอยู่ภายในอนุภาคของแข็งหรืออยู่ระหว่างไขมันแข็งและชั้นของสารลดแรงตึงผิว สูตรตำรับที่เตรียมได้มีรูปแบบการจัดเรียงตัวของยาในลักษณะที่เป็นพิษต่อเซลและผลของการสลายตัวของเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าฟังจิโซน ซึ่งแสดงว่าระบบนำส่งดังกล่าวสามารถลดความเป็นพิษของยาได้ การปลดปล่อยยาจากระบบขึ้นกับการจัดเรียงตัวของยาและประสิทธิภาพในการบรรจุยา ในสูตรตำรับที่บรรจุยาร้อยละ 5 แสดงการปลดปล่อยยาเป็น 2 ช่วง การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธีภายนอกร่างกายพบว่าทุกสูตรตำรับที่ได้รับการคัดเลือกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้เท่ากับหรือมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยาแอมโฟเทอริซิน บี และฟังจิโซน จากการทดสอบโดยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ไม่พบอันตรกริยาระหว่างแอมโฟเทอริซิน บี และส่วนประกอบอื่นในตำรับ ผลของดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงคาลอริเมทรี ฮอทสเตทไมโครสโกปี และเอกซเรย์ดิฟแฟรกโทเมทรี แสดงให้เห็นว่าแอมโฟเทอริซิน บี ที่อยู่ในเมทริกซ์ของไขมันกระจายอยู่ในระดับโมเลกุล หรือรูปอสัณฐาน ยกเว้นสูตรตำรับที่บรรจุยาร้อยละ 5

ภาควิชา.....เภสัชอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อนิสิต.....ภาสวีร์ จันทร์สุก.....

สาขาวิชา.....เภสัชอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2548.....

##4676611733 MAJOR : MANUFACTURING PHARMACY
KEYWORD : AMPHOTERICIN B / SOLID LIPID NANOPARTICLES / NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS / STABILITY

PHATSAWEE JANSOOK: DEVELOPMENT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS CONTAINING AMPHOTERICIN B. THESIS ADVISOR: PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ, Ph.D., 294 pp. ISBN 974-53-2486-8

Amphotericin B (AmB) is one of the most effective systemic antifungal agents, but its use is circumscribed by the dose-limiting toxicity of the conventional micellar dispersion formulation, Fungizone®. To lower its toxicity, AmB incorporated into aqueous dispersion of lipid nanoparticles was proposed. The paper describes the development of two types of lipid nanoparticles. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) made from glyceryl behenate (GB) and glyceryl palmitostearate (GP) were prepared by either hot high pressure homogenization (HPH) or warm microemulsion (WME) techniques in order to evaluate the physical stability of these particles, as well as the chemical stability of drug during storage at 4°C for 3 months. NLC differed from SLN by the presence of liquid lipid (glyceryl tricaprylate/caprate) in the lipid matrix. The results indicated that these two lipid nanoparticles could be colloidal carriers for intravenous therapy. The optimized AmB-SLN formulations had an average diameter less than 300 nm, exhibited monodispersity and carried a negative charge. The AmB content was rapidly degraded when using tween 80 or cremophor EL as stabilizers. The best formulation of SLN dispersion prepared by HPH method consisted of 3% GP and 2% poloxamer 407 (P407), while the best formulation of SLN formulation prepared by WME method consisted of 10% GP, 20% cremophor RH40 and 20% glycerin. Lyophilized AmB-loaded SLN was not success possible due to incomplete lyophilization process. Entrapment efficiency of AmB was improved by blending small amounts of liquid oils with solid lipids. A significant increase in the encapsulation efficacy of NLC containing P407 was noted when compared to that of SLN formulation. In addition, the application of lecithin in the SLN dispersions could increase the amount of drug into the particles. The ^{1}H-NMR data indicated the formation of oil clusters within the solid nanoparticles or the presence between the solid platelet and the surfactant layer. Both AmB-SLN and AmB-NLC formulation have less aggregated species and hemolytic response than Fungizone® indicating that lipid nanoparticles could reduce its toxicity. The release profiles of AmB formulations depended on its aggregated form and entrapment efficiency. Furthermore, the formulation containing 5% AmB showed a drug release by a biphasic profile. For *in vitro* antifungal testing, all of the selected AmB formulations were equal and more effective than both AmB itself and Fungizone®. It was demonstrated by IR spectra that there was no chemical reaction occured between AmB and other components. The DSC, HSM, X-ray diffractograms showed that AmB in lipid matrix was in either molecularly dispersed or amorphous form except the formulation containing 5% drug loading.

Department....Manufacturing Pharmacy.....Student's signature Phatsawee Jansook

Field of study...Industrial Pharmacy.....Advisor's signature Garnpimol C. Ritthidej

Academic year.....2005.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks and gratitude to my thesis adviser, Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D. for her invaluable advice, guidance, encouragement and understanding. Her kindness and helpfulness are also deeply appreciated.

I also wish to express deep appreciation to Assistant Professor Wichein Thanindratarn, Professor Narong Sarisuta, Assistant Professor Pornanong Aramwit and Dr. Narueporn Sutanthavibul for spending their valuable times to be on my thesis committee and for their scrutinizing and discussion.

Special thanks are given to the Graduate School of Chulalongkorn University and the Ministry of University Affair for granting partial financial support to fulfill this study.

My sincere gratitude is extended to Associate Professor Rutt Sutthisri and Associate Professor Vimolmas Lipipun for proving ^{1}H-NMR study and AmB susceptibility testing, respectively and also Miss Sombun Srimuang and Mrs. Tassanee Loenoo at Research Institute Unit, Ramathipbadi Hospital for partial support in *in vitro* antifungal test

The other special thank to Research Institute Department, Government Pharmaceutical Organization, Thailand for supporting in particle size determination.

Also, I would like to express my infinite thanks and deepest gratitude to my friends, colleagues and staff members of the Department of Manufacturing Pharmacy for their assistance and encouragement.

Above all, I would like to express my thanks to my mother, my sisters and my brother for their assistance, care, cheerfulness, and encouragement.

Finally, I wish to thank other persons whose names have not been mentioned here for their assistance and encouragement.

CONTENTS

Page

LIST OF TABLES

Table **Page**

Table **Page**

Table **Page**

Table **Page**

Table **Page**

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

ABBREVATIONS

%	percentage
°C	degree Celsius (centrigrade)
µg	microgram (s)
µl	microlitre (s)
µm	micrometer (s)
λ_{max}	wavelength of maximum absorption
<	less than
>	more than
^{1}H-NMR	proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
ABCD	AmB colloidal dispersion
AFM	atomic force microscopy
AmB	amphotericin B
AmBD	AmB deoxycholate
ABLC	AmB lipid complex
AUC	area under the curve
AWP	average wholesale price
BCG	Bacillus of Calmette and Guérin
cm^{-1}	the reciprocal of centimeter
C_{max}	maximum plasma concentration
CFT	critical flocculation temperature
CMC	critical micelle concentration
CreEL	cremophor EL
CreRH	cremophor RH40
Cryo-SEM	cryo-scanning electron microscopy
CSF	cerebrospinal fluid
CV	coefficient of variation
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DSC	differential scanning calorimetry
e.g.	for example, exempli gratia
EE	entrapment efficiency

ESR	electron spin resonance
et.al.	et alli, and others
FD	freeze-dried
FDA	Food and Drug Administration
FFF	field-flow fractionation
FT-IR	fourier transform infrared
g	gram (s)
GB	glyceryl behenate
Gly	glycerin
GP	glyceryl palmitostearate
GRAS	Generally recognized as safe (US food and drug)
HLB	hydrophilic lipophilic balance
HPH	high pressure homogenization
HPLC	high-performance liquid chromatography
h	hour (s)
HSM	hot stage microscopy
i.e.	id est (that is)
i.m.	intramuscular
i.v.	intravenous
IR	infrared
km	kilometer (s)
LAF	laminar air flow cabinet
L-AmB	Liposomal AmB
LD	laser diffraction
LDL	low-density lipoprotein
LDH	lactate dehydrogenase
log	logarithm
M52	myrj 52
M59	myrj 59
MCT	medium chain triglyceride
MeOH	methanol
MFC	minimum fungicidal concentration
mg	milligram (s)
MIC	minimum inhibitory concentration

min	minute (s)
ml	milliliter (s)
mOsm/L	milliosmols per liter
MPS	mononuclear phagocytic system
MRT	mean residence times
mV	millivolt (s)
MW	molecular weight
N	normality
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NLC	nanostructured lipid carriers
nm	nanometer (s)
NMR	magnetic resonance spectroscopy
No.	number of sample
OTC	oxytetracycline
o/w	oil in water emulsion
P118	poloxamer 118
P407	poloxamer 407
PCS	photon correlation spectroscopy
PEG	polyethylene glycol 400
PG	propylene glycol
pH	the negative logarithm of the hydrogen ion concentration
PI	polydispersity index
PL	phospholipon®90H
PM	physical mixture
po	peroral
ppm	parts per million
psi	pound (s) per square inch
PXRD	powder X-ray diffractometry
R^2	coefficient of determination
RBCs	red blood cells
RES	reticuloendothelial system
rpm	revolution (s) per minute

RT	retention time
SAXS	small angle X-ray scattering
s.c.	subcutaneous
SD	standard deviation
SLM	solid lipid microparticles
SLN	solid lipid nanoparticles
TEM	transmission electron microscopy
TGF	tubuloglomerular feedback
Tw20	tween 20
Tw80	tween 80
UV	ultraviolet
v/v	volume by volume
W	water
w/v	weight by volume
w/w	weight by weight
WME	warm microemulsion
w/o/w	water in oil in water
ZP	zeta potential