ผลของปัจจัยในการตั้งตำรับต่อคุณสมบัติทางกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลองของโพรพิลไธโอยูเรซิลไลโปโซม

นางสาวรัตนา รัตนตรัยภพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-620-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19521984

EFFECTS OF FORMULATION FACTORS ON PHYSICAL PROPERTIES AND IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROPYLTHIOURACIL LIPOSOMES

MISS RATTANA RATTANATRAIPHOP

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-346-620-7

Thesis Title	Effects of formulation factors on physical properties and in vitro biological activity of propylthiouracil liposomes
By	Miss Rattana Rattanatraiphop
Department	Pharmacy
Thesis Advisor	Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.

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

..... Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Porntip Nimnannitya)

..... Thesis Advisor

(Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Panida Vayumhasuwan, Ph.D.)

รัตนา รัตนตรัยภพ: ผลของปัจจัยในการตั้งตำรับต่อคุณสมบัติทางกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลองของโพรพิลไธโอยูเรซิลไลโปโซม.(EFFECTS OF FORMULATION FACTORS ON PHYSICAL PROPERTIES AND IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROPYLTHIOURACIL LIPOSOMES) อาจารย์ที่ปรึกษา: อ. ดร. นนทิมา วรรธนะภูติ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 135 หน้า. ISBN 974-346-620-7.

เมื่อเตรียมโพรพิลไธโอยูเรซิลไลโปโซมเพื่อใช้เป็นยาทาผิวหนังสำหรับรักษาโรคสะเก็ดเงิน โดยวิธีการระเหยกลับเฟสพบว่า โพรพิลไธโอยูเรซิลมีการกระจายตัวระหว่างเฟสไขมันและเฟสน้ำของไลโปโซม โดยในระบบที่ไม่อิ่มตัวด้วยยาความเข้มข้นของไขมันที่ใช้เป็นส่วนประกอบมีผลต่อการเก็บกักยาในไลโปโซม แต่ในระบบที่ละลายยาให้อิ่มตัวในทั้ง 2 เฟสความเข้มข้นของไขมันไม่มีผลต่อการเก็บกักยาในไลโปโซมและความสามารถในการเก็บกักยาสูงที่สุด ประจุของไลโปโซม, พีเอช, และการมีคอเลสเตอรอลในไลโปโซมมีผลต่อการเก็บกักยาในไลโปโซม ไลโปโซมที่มีการเก็บกักยาได้สูงที่สุดเมื่อแบ่งตามประจุของไลโปโซมคือ ไลโปโซมประจุลบที่พีเอช 7.4, ไลโปโซมที่ไม่มีประจุที่พีเอช 7.4, และไลโปโซมประจุบวกที่พีเอช 9.0 การมีคอเลสเตอรอลในไลโปโซมทำให้การเก็บกักยาในไลโปโซมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาการปลดปล่อยยาออกจากตำรับและการระเหยของน้ำออกจากตำรับพบว่า โพรพิลไธโอยูเรซิลไลโปโซมสามารถปลดปล่อยยาออกมาอย่างช้าๆ และลดอัตราการระเหยของน้ำออกจากตำรับ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าทั้งโพรพิลไธโอยูเรซิลในรูปอิสระและในรูปไลโปโซมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด BALB/c 3T3 อย่างไรก็ตามโพรพิลไธโอยูเรซิลไลโปโซมแสดงลักษณะการออกฤทธิ์นาน โพรพิลไธโอยูเรซิลไลโปโซมมีความคงตัวทางกายภาพเป็นเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์เมื่อเก็บในตู้เย็น

ภาควิชา เภสัชกรรม
สาขาวิชา เภสัชกรรม
ปีการศึกษา 2543

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

4176577633 MAJOR: PHARMACY
KEYWORD: PROPYLTHIOURACIL / LIPOSOMES / PSORIASIS / RELEASE / FIBROBLAST / CELL CULTURES / STABILITY

RATTANA RATTANATRAIPHOP: EFFECTS OF FORMULATION FACTORS ON PHYSICAL PROPERTIES AND IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROPYLTHIOURACIL LIPOSOMES. THESIS ADVISOR: NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D. 135 pp. ISBN 974-346-620-7.

Propylthiouracil (PTU) was encapsulated in reverse phase evaporation liposomes for the purpose of topical treatment of psoriasis. PTU partitioning between the liposomal bilayer and the aqueous phase depended on lipid concentration when the liposomal system was not saturated with PTU. In the system with saturation of PTU, on the other hand, lipid concentration did not affect PTU encapsulation. The PTU-saturated system also gave the highest encapsulation efficiency. Surface charge, pH, and cholesterol content had interaction effects on PTU encapsulation. With respect to liposomal charge, negative liposomes at pH 7.4, neutral liposomes at pH 7.4, and positive liposomes at pH 9.0, without cholesterol, gave the highest encapsulation efficiency. The presence of cholesterol in liposomes decreased encapsulation efficiency. Liposomal formulations provided sustained release of PTU as well as retarded dehydration. Both free PTU and PTU liposomes could inhibit BALB/c 3T3 mouse fibroblast proliferation to a similar degree. However, PTU liposomes showed the sustained release characteristic. PTU liposomes were physically stable for at least 8 weeks when stored in a refrigerator (4-8 °C).

Department	Pharmacy	Student's signature.....
Field of study	Pharmacy	Advisor's signature.....
Academic year	2000	Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, my co-advisor, for her guidance, kindness, and invaluable advice.

I would like to acknowledge the thesis committee for their valuable scrutinizing and discussion.

I am deeply thankful to Dr. Chanchai Hosanguan for his contribution in statistics and to Associate Professor Waraporn Suwakul for her valuable comments on Thai version of the abstract.

I am gratified to Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences and also to Department of Microbiology for the provision of facilities in cell culture experiments.

Special thanks are extended to grants from the Graduate School, Department of Pharmacy, and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. Also, I would like to thank all the faculty members in the Department of Pharmacy for their assistance and encouragement.

Above all, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their endless love, care, and encouragement throughout my life.

My deep appreciation goes to Utsana Puapermpoonsiri, my friends, and other persons whose names have not been mentioned for their assistance and cheerfulness. Thank you all.

CONTENTS

ABSTRACT [THAI]....iv
ABSTRACT [ENGLISH]....v
ACKNOWLEDGEMENTS....vi
CONTENTS....vii
LIST OF TABLES....viii
LIST OF FIGURES....ix
LIST OF ABBREVIATIONS....x
CHAPTER
I INTRODUCTION....1
II LITERATURE REVIEW....4
III MATERIALS AND METHODS....33
IV RESULTS AND DISCUSSION....48
V CONCLUSIONS....75
REFERENCES....77
APPENDICES....84
VITA....135

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

1. The solubility data of PTU in three different buffers.....48
2. Effects of preparation method, lipid concentration, and equilibrating time on encapsulation efficiency of PTU.....50
3. Interactions of preparation method, lipid concentration, and equilibrating time on encapsulation efficiency of PTU liposomes.....50
4. Encapsulation efficiency of PTU liposomes prepared by organic-aqueous PTU method.....51
5. Interactions of preparation method, lipid concentration, and equilibrating time on encapsulation efficiency of PTU liposomes prepared by organic-aqueous PTU method.....51
6. Effects of liposomal charge, pH, and cholesterol content on encapsulation efficiency of PTU liposomes.....55
7. Interactions of liposomal charge, pH, and cholesterol content on encapsulation efficiency of PTU liposomes.....55

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

1. The pathophysiological mechanisms responsible for psoriasis.....6
2. Types of liposomes depending on size and number of lamellae 9
3. Chemical structure of some common phospholipids 9
4. Effect of molecular geometry on phase properties of lipids 12
5. Diagram of the formation of REVs.....14
6. Diagrammatic representation the various sites in the liposome available for drug entrapment.....15
7. Cross-section of the skin.....21
8. Interactions of preparation method, lipid concentration, and equilibrating time on encapsulation efficiency of PTU liposomes.....51
9. Interactions of liposomal charge, pH, and cholesterol content on encapsulation efficiency of PTU liposomes.....57
9. Morphology of PTU liposomes determined by scanning electron microscopy.....59
10. Release profiles of PTU liposomes and saturated PTU solution.....62
11. Water evaporation profiles of PTU liposomes and PTU saturated solution 63
12. Water evaporation profiles of PTU liposomes in the presence and absence of cholesterol 64
13. Effect of the incubation time on proliferation of BALB/c 3T3 fibroblasts. 67
14. Effect of PTU and caffeine (1.1 mg/ml) on BALB/c 3T3 proliferation.....68
15. Effect of PTU solution in the presence and absence of CS in DMEM+ on BALB/c 3T3 proliferation.....68
16. Effect of PTU liposomes on BALB/c 3T3 proliferation.....69
17. Effect of incubation time of 1 day and 3 days on antiproliferative effect of PTU liposomes on BALB/c 3T3 proliferation.....69
18. Encapsulation efficiency of PTU liposomes after 8 weeks of storage in a refrigerator.....73

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	=	analysis of variance
CH	=	cholesterol
CS	=	calf serum
DCP	=	dicetylphosphate
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPC	=	dimyristoyl phosphatidylcholine
DPPC	=	dipalmitoyl phosphatidylcholine
LUV	=	large unilamellar vesicle
MLV	=	multilamellar vesicle
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mmol	=	millimole
mM	=	millimolar
MW	=	molecular weight
MWCO	=	molecular weight cut off
nm	=	nanometer
PA	=	phosphatidic acid
PC	=	phosphatidylcholine
PG	=	phosphatidylglycerol
PS	=	phosphatidylserine
PTU	=	propylthiouracil
REV	=	reverse phase evaporation vesicle
SA	=	stearylamine
SEM	=	standard error of mean
SNK	=	Student-Newman-Keuls
SUV	=	small unilamellar vesicle
a_m	=	molar absorptivity
T_c	=	phase transition temperature
μg	=	microgram
μm	=	micrometer