การเตรียมและการประเมินผลไลโปโซมของกรดแลกติก

นางสาว อรวรรณ นิยมปัทมะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-116-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 16310156

PREPARATION AND EVALUATION OF LACTIC ACID LIPOSOMES

Miss Orawan Niyompattamah

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacy
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-638-116-4

Thesis Title	Preparation and Evaluation of Lactic Acid Liposomes
By	Miss Orawan Niyompattamah
Department	Pharmacy
Thesis Advisor	Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Associate Professor Pranom Pothiyanont)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Panida Vayumhasuwan, Ph. D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อรวรรณ นิยมปัทมะ : การเตรียมและการประเมินผลไลโปโซมของกรดแลกติก (PREPARATION AND EVALUATION OF LACTIC ACID) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. นนทิมา วรรธนะภูติ, 142 หน้า. ISBN 974-638-116-4.

ในการศึกษานี้ กรดแลกติกซึ่งเป็น alpha-hydroxy acid ที่มีคุณสมบัติในการดูดความชื้น เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง และกระตุ้นการผลัดเปลี่ยนเซลล์ใหม่ ได้ถูกนำมาเตรียมเป็นไลโปโซมเพื่อให้ออกฤทธิ์ได้นานขึ้นและลดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ไลโปโซมของกรดแลกติกที่เตรียมได้จากเลซิทินของไข่แดง โดยวิธีการระเหยกลับวัตภาค เป็นชนิดที่มีผนังชั้นเดียว ขนาดประมาณ 100-500 นาโนเมตร เปอร์เซนต์การกักเก็บของกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟอสโฟไลปิด อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการกักเก็บของกรดแลกติกในหน่วยโมลของกรดแลกติกต่อโมลของไขมันมีค่าไม่แตกต่างกัน การเพิ่มความเข้มข้นของกรดแลกติกเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บของกรดแลกติก ซึ่งมีขีดจำกัดที่ความเข้มข้นของกรดแลกติกในช่วง 80-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประจุของไลโปโซม พีเอช และความแรงของไอออน มีผลร่วมกันต่อประสิทธิภาพการกักเก็บ ไลโปโซมชนิดที่มีประจุบวกที่พีเอช 4และความแรงของไอออนเท่ากับ 0.1 มีประสิทธิภาพการกักเก็บของกรดแลกติกสูงสุด และใกล้เคียงกับไลโปโซมชนิดที่ไม่มีประจุ ที่พีเอช 5และความแรงของไอออนเท่ากับ 0.5 การเติมโคเลสเตอรอลทั้งในไลโปโซมชนิดที่มีประจุบวกและไลโปโซมชนิดที่ไม่มีประจุลดประสิทธิภาพการกักเก็บของกรดแลกติกในไลโปโซม กรดแลกติกถูกปลดปล่อยออกจากไลโปโซมชนิดที่มีประจุบวกได้เร็วกว่าจากไลโปโซมชนิดที่ไม่มีประจุ การเติมโคเลสเตอรอลในไลโปโซมทั้งสองชนิดทำให้กรดแลกติกถูกปลดปล่อยได้เร็วขึ้น ไลโปโซมชนิดที่ไม่มีประจุกักเก็บกรดแลกติกไว้ได้ดีกว่าไลโปโซมชนิดที่มีประจุบวกเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ การรั่วของกรดแลกติกในไลโปโซมชนิดที่ไม่มีประจุที่มีโคเลสเตอรอลและแอลฟาโทโคเฟอรอลเกิดขึ้นได้น้อยมาก

ภาควิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2540	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C875061 : MAJOR PHARMACY
KEY WORD: LIPOSOMES / LACTIC ACID / ENTRAPMENT / RELEASE / STABILITY
ORAWAN NIYOMPATTAMAH : PREPARATION AND EVALUATION OF LACTIC ACID LIPOSOMES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. UBONTHIP NIMMANNIT, Ph. D. THESIS CO-ADVISOR : NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph. D. 142 pp. ISBN 974-638-116-4

In this study lactic acid, a hygroscopic alpha-hydroxy acid which is used topically for increasing skin moisture content and stimulating skin cell renewal, was encapsulated within liposomes to sustain action and decrease skin irritation. Lactic acid liposomes were prepared from egg yolk lecithin by reverse phase evaporation method. The prepared vesicles of lactic acid were LUVs in the size range of 100-500 nm. The percentage of lactic acid entrapment increased when phospholipid concentration was increased. However, the encapsulation efficiency of lactic acid expressed as moles of lactic acid per mole of lipid did not differ. An increase in lactic acid concentration increased the encapsulation efficiency of lactic acid, which reached a limit at some point where lactic acid concentration was between 80-100 mg/ml. Liposomal charge, pH, and ionic strength had interaction effects on encapsulation efficiency ($p<0.05$). The positively charged liposomes at pH 4 ($\mu=0.1$) gave the highest encapsulation efficiency which was similar to that of the neutral liposomes at pH 5 ($\mu=0.5$). Inclusion of cholesterol in both positive and neutral liposomes decreased encapsulation efficiency. Lactic acid in positively charged liposomes was released faster than that in neutral liposomes. Inclusion of cholesterol into both types of liposomes resulted in faster release. The neutral liposomes retained lactic acid better than the positively charged liposomes when stored in refrigerator for one week. Leakage of lactic acid from neutral liposomes with cholesterol and α-tocopherol was negligible.

ภาควิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2540	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my special, sincere thanks and gratitude to my advisor, Associate Professor Ubonthip Nimmannit, for her invaluable advice, guidance, patience, kindness, encouragement and understanding throughout this study.

I am also deeply thankful to Dr. Nontima Vardhanabhuti, my co-advisor for her kindness, encouragement, and invaluable advice.

I am obliged to the members of thesis committee for their valuable scrutinizing and discussion.

Special thanks are extended to grants from the Graduate School, Department of Pharmacy and the Government Fund through 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 sincere and deepest grateful to my parents for their endless love, care, and encouragement throughout my life.

Finally, my deep appreciation goes to my friends and other persons whose names have not been mentioned for helping me in anyway during the time of my study. 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 xi
CHAPTER
I INTRODUCTION 1
II LITERATURE REVIEWS 4
III MATERIALS AND METHODS 35
IV RESULTS AND DISCUSSION 52
V CONCLUSIONS 91
REFERENCES 93
APPENDIX I 103
APPENDIX II 125
APPENDIX III 132
VITA 142

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

1. Summary of size, encapsulation efficiency, and internal volume of different liposome preparations....10
2. Typical values of different types of liposomes....12
3. Accuracy data of lactic acid solution analysis....53
4. Data for accuracy of analysis of lactic acid in liposome suspension....53
5. Accuracy and precision data of seperation of lactic acid from liposomes....54
6. Within run precision data....55
7. Between run precision data....55
8. Data for calibration curve of standard solutions of lactic acid....57
9. Calibration curve data of anhydrous potassium dihydrogen phosphate standard solution; absorbances were measured at 800 nm....60
10. The captured volume of EPC liposomes prepared at different EPC concentrations....65
11. Effect of phospholipid concentration on lactic acid entrapment....67
12. Effect of phospholipid concentration on encapsulation efficiency of lactic acid in neutral liposomes....68
13. Effect of lactic acid concentration on lactic acid entrapment....70
14. Effect of pH and ionic strength on lactic acid entrapment in different liposomes....72
15. Effect of pH on lactic acid entrapment in the different liposomes (μ=0.1)....73
16. Effect of pH on lactic acid entrapment in the different liposomes (μ=0.5)....75
17. Effect of cholesterol on lactic acid entrapment....78

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

1. Chemical structure of naturally ocurring phospholipids.....5
2. Types of liposomes: SUV = small unilamellar vesicle; LUV = large unilamellar vesicle; MLV = multilamellar vesicle; MVV = multivesicular vesicle 5
3. Structural formula of cholesterol.....8
4. Chemical structures of dicetylphosphate (DCP) and stearylamine (SA).....9
5. Diagram of the formation of REVs.....10
6. Schematic representation of an unilamellar and multilamellar vesicular structure.....12
7. Chemical structure of α- tocopherol.....16
8. Diagram of skin structure and possible routes of liposome penetration.....28
9. Structures of some α-hydroxy acids.....33
10. The HPLC chromatograms of lactic acid in the pellet and in the supernatant.....56
11. The representation of calibration curve of standard solutions of lactic acid.....58
12. The HPLC chromatograms of the standard solutions of lactic acid and the internal standard.....59
13. A representation of calibration curve of standard phosphorus solutions using the Bartlett assay.....61
14. Scanning electron photomicrographs of EPC lactic acid liposomes.....63
15. Transmission electron photomicrographs of EPC lactic acid liposomes.....64
16. Effect of phospholipid concentration on lactic acid entrapment.....67
17. Effect of phospholipid concentration on encapsulation efficiency of lactic acid in neutral liposomes.....68
18. Effect of lactic acid concentration on lactic acid entrapment.....70
19. Effect of pH on lactic acid entrapment in the different liposomes (μ=0.1).....73
20. Effect of pH on lactic acid entrapment in the different liposomes (μ=0.5).....75

FIGURE PAGE

21. Effect of ionic strength on lactic acid entrapment in positive liposomes at the pH of 5 77
22. Influence of cholesterol on lactic acid entrapment 78
23. The HPLC chromatograms of lactic acid released from different types of liposomes in the receptor cell containing the iso-osmotic phosphate buffer at the pH of 4 and 5 82
24. Release profiles of entrapped lactic acid from different types of liposomes at 37 °C 83
25. Release profiles of entrapped lactic acid from different types of liposomes at 4 °C 85
26. Release profiles plotted as the percentage of lactic acid released from neutral liposomes without cholesterol (pH 5, μ=0.5) against the square root of time 86
27. Release profiles plotted as the percentage of lactic acid released from positive liposomes without cholesterol (pH 4, μ=0.1) against the square root of time 87
28. Release profiles plotted as the percentage of lactic acid released from neutral liposomes without cholesterol (pH 5, μ=0.5) against the square root of time 87
29. Release profiles plotted as the percentage of lactic acid released from positive liposomes with cholesterol (pH 4, μ=0.1) against the square root of time 88
30. Retention time of lactic acid in different liposomes at 4°C for one week 90

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	=	analysis of variance
approx	=	approximately
Chol	=	cholesterol
DCP	=	dicetyl phosphate
DMPC	=	dimyristoyl phosphatidylcholine
DPPC	=	dipalmitoyl phosphatidylcholine
EPC	=	egg phosphatidylcholine
LUVs	=	large unilamellar vesicles
MLVs	=	multilamellar vesicles
mcg	=	microgram
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
MW	=	molecular weight
MWCO	=	molecular weight cut off
PAR	=	peak area ratio
PG	=	phosphatidylglycerol
r	=	correlation coefficient
R^2	=	coefficient of determination
REVs	=	reverse phase evaporation vesicles
SA	=	stearylamine
SUVs	=	small unilamellar vesicles
Tc, T_m	=	phase transition temperature
μ	=	ionic strength
μm	=	micrometer
μmol	=	micromole