Thesis Title	Effects of Amphotericin B Entrapment in Liposomes on Skin Absorption
Author	Miss Lalana Kongkaneramit
M.Pharm.	Pharmaceutical Technology

Examining Committee :	Associate Prof. Dr. Aranya	Manosroi	Chairman
	Associate Prof. Dr. Jiradej	Manosroi	Member
	Associate Prof. Dr. Boonsom	Liawruangrath	Member
	Associate Prof. Pimporn	Leelapornpisid	Member

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of amphotericin B (AmB) entrapped in liposomes on the rat skin absorption. Fungizone® which contained 0.45 mg of AmB/mg was used. The eight multilamellar liposomes composed of hydrogenated soya phosphatidylcholine (Emulmetik 950®) / cholesterol / charged lipids { dicetyl phosphate (-) or stearylamine (+) } in the molar ratios of 1:1, 7:2, 7:2:1(-) and 7:2:1(+) with the entrapped AmB (0.05 mg/mg lipid) and without the entrapped AmB were prepared by a chloroform-film method with sonication. The charges of liposomes were characterized by a zetameter. The negative liposomes with and without the entrapped AmB showed higher surface charge density than other liposome formulations. The size distribution of all liposomes with and without the entrapped AmB determined from 100 particles of each sample by SEM was in the range of 0.115 to 0.364 μm with the smallest size of 0.115 μm observed in the negative liposomes with the entrapped drug {7:2:1(-)AmB }. The lamellarity of more than 15 layers was obviously observed by TEM in the neutral 7:2AmB liposome.

HPLC with the UV detector at 382 nm with validated conditions was used to assay for the AmB contents (retention time at 4.6 mins) in all formulations. The percentages of the entrapment of AmB in all liposome formulations were more than 85% with the highest entrapment of 90% in the positive liposomes {7:2:1(+)AmB}. Fungizone®, Emulmetik 950® and all eight liposome formulations by DSC study revealed two endothermic peaks. The T_c and ΔH from the DSC curves were used for the prediction and comparison of interaction and thermal stability of liposome formulations. The drug aggregation on liposomal membrane of the positive and negative liposomes was expected, thereby causing phase separation. Both entrapped and unentrapped AmB positive liposomes demonstrated higher ΔH indicating higher rigidity of liposomal membrane than other formulations.

Physical and chemical stability of all liposome formulations were compared with AmB in solution and powder form when kept at 4±1°C, 30±1°C and 45±1°C for 90 days. The most possible degradation kinetic of AmB in all systems was fitted to the Higuchi model. The drug in solution, powder forms and in all liposome formulations demonstrated increasing degradation rates with increasing temperatures. The lowest degradation rate was found in the positive 7:2:1(+)AmB. The shelf life at 30°C evaluated by the Arrhenius equation of the drug in this liposome was about 1 year whereas the drug in solution and powder forms were 4 and 14 days respectively.

For absorption study through the rat skin by vertical Franz diffusion cells at 37±1°C for 24 hrs, only AmB in DMSO/methanol was found in the receiver medium with the mean flux of 4.26 ng/cm^2 per hr. The highest flux was found in Fungizone® solution of 124 and 127 ng/cm^2 per hr in stratum corneum (SC) and viable epidermis and dermis (VED/D) respectively. In comparing all liposome formulations, AmB entrapped in positive liposomes gave the highest flux in SC of 58 ng/cm^{2}per hr while the highest flux in VED of 23 ng/cm^2 per hr was observed in the negative AmB liposomes. This showed the sustained skin absorption effect of AmB when entrapped in charged liposomes. This study achieved the positively charged liposomes as the best formulation for AmB because its higher stability and deeper penetration with delay absorption effect than any other formulations. This formulation has potential to develop as a commercial pharmaceutical preparation in topical fungal treatment.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของการเก็บกักแอมโฟเทอริซินบีในไลโปโซมต่อการดูดซึมผ่านผิวหนัง
ชื่อผู้เขียน	นางสาวลลนา คงคาเนรมิตร
เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญญา	มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. จีรเดช	มโนสร้อย	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม	เหลี่ยวเรืองรัตน์	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ พิมพร	ลีลาพรพิสิฐ	กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเก็บกักแอมโฟเทอริซินบี (AmB) ในไลโปโซมต่อการดูดซึมผ่านผิวหนังหนูทดลอง ได้ใช้ฟังจิโซน® ซึ่งมี AmB ในปริมาณ 0.45 มก. ในฟังจิโซน® 1 มก. ได้เตรียมมัลทิลาเมลลาไลโปโซม ที่มีส่วนประกอบของไขมันไฮโดรเจนเนตเตทโซยาฟอสฟาทิดิลโคลีน (Emulmetik 950®) / โคเลสเตอรอล / ไขมันมีประจุ {ไดเซทติลฟอสเฟต (ลบ) หรือ สเตียริลลามีน (บวก)} ในอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 1:1, 7:2, 7:2:1(-) และ 7:2:1(+) ที่มีตัวยา (0.05 มก. ต่อไขมัน 1 มก.) และไม่มีตัวยา โดยวิธีคลอโรฟอร์ม - ฟิลม์ ร่วมกับการใช้คลื่นความถี่สูง ได้ตรวจสอบชนิดของประจุของไลโปโซมโดยเครื่องซีตามิเตอร์ ไลโปโซมประจุลบทั้งที่เก็บกักและไม่เก็บกักตัวยา AmB มีความหนาแน่นประจุที่ผิวสูงกว่าไลโปโซมตำรับอื่น ได้ศึกษาขนาดอนุภาคและการกระจายของขนาดอนุภาคของตำรับไลโปโซมทั้งที่เก็บกักและไม่เก็บกัก AmB โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างละ 100 อนุภาค พบว่ามีช่วงของขนาดอนุภาค 0.115 ถึง 0.364 ไมครอน โดยไลโปโซมประจุลบที่เก็บกัก AmB { 7:2:1(-)AmB } จะมีขนาดที่เล็กที่สุด คือ 0.115 ไมครอน จากการศึกษาจำนวนชั้นของผนังไขมันไลโปโซมโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ของตำรับ 7:2AmB พบว่ามีจำนวนชั้นมากกว่า 15 ชั้น

ในการศึกษานี้ได้ตรวจสอบวิเคราะห์ปริมาณ AmB โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีสมรรถนะสูง (HPLC) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 382 นาโนเมตร พบว่า AmB มีเวลาที่ใช้ในคอลัมน์ 4.6 นาที จากการศึกษาร้อยละในการเก็บกัก AmB ไลโปโซมพบว่าทุกตำรับมีปริมาณเก็บกักมากกว่าร้อยละ 85 โดยพบสูงสุดร้อยละ 90 ในตำรับไลโปโซมประจุบวก{7:2:1(+)AmB} จากการศึกษา DSC พบว่ามี 2 พีคในตัวอย่างฟังจิโซน® Emulmetik 950® และไลโปโซมทุกตำรับ ค่าอุณหภูมิทรานซิชัน (T_c) และเอนธัลปีของการทรานซิชัน (ΔH) จากกราฟของ DSC ได้นำมาใช้ทำนายและเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาและความคงตัวของตำรับ คาดว่าทั้งในตำรับไลโปโซมประจุบวกและประจุลบที่เก็บกัก AmB จะมีการจับรวมกันบนผนังไลโปโซมทำให้มีการแยกตัวเกิดขึ้น และไลโปโซมประจุบวกทั้งที่เก็บกักและไม่เก็บกัก AmB มีความแข็งแรงของผนังไลโปโซมสูงกว่าตำรับอื่น

จากการเปรียบเทียบความคงตัวทางกายภาพและเคมีของตัวยาในไลโปโซมตำรับต่างๆกับตัวยาในรูปสารละลายและเป็นผงของฟังจิโซน® เมื่อเก็บไว้ที่ 4±1°ซ 30±1°ซ and 45±1°ซ เป็นเวลา 90 วัน ได้ใช้รูปแบบการสลายตัวของตัวยาด้วย Higuchi model ซึ่งพบว่าเหมาะสมที่สุด อัตราการสลายตัวของตัวยาในทุกตำรับจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ พบว่าไลโปโซมประจุบวกที่เก็บกัก AmB มีอัตราการสลายตัวช้าที่สุด อายุของตำรับนี้เมื่อประเมินโดยสมการอาร์รีเนียสจะมีอายุประมาณ 1 ปีที่อุณหภูมิ 30°ซ ในขณะที่ตัวยาในรูปของสารละลายและผงยามีอายุ 4 และ 14 วันตามลำดับ

จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังหนูทดลองโดยใช้เครื่อง vertical Franz diffusion cell แนวราบที่ 37±1°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีเพียงตำรับ AmB ใน DMSO/เมธานอลเท่านั้นที่สามารถผ่านจากผิวหนังเข้าสู่เซลล์ตัวรับด้วยค่าฟลักซ์เฉลี่ย 4.26 นก./ซม.^{2} ต่อ ชม. สารละลายฟังจิโซนให้ฟลักซ์เฉลี่ยสูงสุดในชั้นสตราตัมคอร์เนียม (SC) และชั้นอิพิเดอร์มิสที่มีชีวิตและเดอร์มิส (VED/D) เท่ากับ 124 และ 127 นก./ซม.^{2}ต่อ ชม. ตามลำดับ ในการเปรียบเทียบระหว่างตำรับไลโปโซมด้วยกัน ตัวยาที่เก็บกักในไลโปโซมประจุบวกจะให้ฟลักซ์เฉลี่ยสูงสุดในชั้น SC เท่ากับ 58 นก./ซม.^{2}ต่อ ชม. และตัวยาในไลโปโซมประจุลบจะให้ฟลักซ์เฉลี่ยสูงสุดในชั้น VED/D เท่ากับ 23 นก/ซม.^{2}ต่อ ชม. ซึ่งแสดงการปลดปล่อยตัวยาเนื่องผ่านผิวเมื่อ AmB เก็บกักในไลโปโซมที่มีประจุ จากผลงานวิจัยนี้พบว่าตำรับไลโปโซมประจุบวกเป็นตำรับที่ดีที่สุด ที่จะนำมาใช้เก็บกัก AmB ทั้งนี้เนื่องจากเป็นตำรับที่มีความคงตัว สามารถดูดซึมผ่านผิวและชะลอการปลดปล่อยได้ดีกว่าตำรับอื่นๆ ซึ่งสามารถนำไปศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาทาภายนอกในเชิงพาณิชย์สำหรับรักษาโรคติดเชื้อราได้ต่อไป