Thesis Title Synthesis of Cationic Lipid for Liposome Preparation

Author Ms. Chonlada Komno

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi Chairperson

Prof. Dr. Jiradej Manosroi Member

Prof. Dr. Rolf G. Werner Member

ABSTRACT

The aim of this study was to synthesize cationic lipids for the preparation of liposomes. The cationic lipid, cholest-5-en-3-ol(3β)(trimethylammonio)acetate (CTA), was synthesized from cholesterol and betaine hydrochloride in dichloromethane. Dimethyl- aminopyridine (DMAP) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC) were used to catalyze the esterification reaction. The reaction temperature was controlled at 40°C and was completed at 48 hours. The percentage yield of the product was 32.22 %. The product was identified by melting point determination, TLC, IR, NMR, LC-MS and HPLC. Other cationic lipids from solasodine/cholestranol and betaine hydrochloride can not be synthesized with this same method because the reaction gave many by-products and very low percentage yields. The purified CTA was used to prepare cationic liposomes in comparing to other liposomal formulations. The liposomal formulations composed of dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)/cholesterol(Chol)/dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) at 7:2:1 molar ratio, DPPC/Chol/CTA at 7:2:1 molar ratio, DPPC/Chol at 7:3 molar ratio, DPPC/CTA/DDAB at 7:2:1 molar ratio and DPPC/CTA at 7:3, 1:1 and 1:2 molar ratio, were prepared by chloroform film method with sonication. The particle size of the liposomes were investigated by dynamic light scattering. Their morphology was determined by optical microscope and their TEM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

images and zeta potential values were investigated by dynamic light scattering. It was found that four blank liposomes composed of DPPC/Chol at 7:3, DPPC/Chol/ DDAB at 7:2:1, DPPC/Chol/CTA at 7:2:1 and DPPC/CTA/DDAB at 7:2:1 molar ratios were showed good physical stability with no sedimentation for 3 months when stored at 4± 2, 30 ± 2 and 45± 2 ^{o}C. The selected four blank liposomes were entrapped with human insulin at the concentration of 0.45 mg/ml in phosphate buffer (pH 7) by freeze dried empty liposome (FDEL) method. The human insulin entrapped in the liposomal formulation composed of DPPC/CTA/DDAB at 7:2:1 molar ratio was selected because it exhibited good physical stability with no sedimentation or layer separation and the color was not changed when stored at 4± 2, 30 ± 2 and 45± 2 ^{o}C for 1 month. The percentages of entrapment efficiency of human insulin determined by gel filtration using Sepharose CL 6B and HPLC of this formulation were at 62.72%. The spherical shape with unilamellar structure of the formulation determined by TEM with an average size of 2.26±0.87 μm was observed. For chemical stability study, the DPPC/CTA/DDAB liposome entrapped with human insulin when stored at 4± 2 , 30 ± 2 and 45± 2 ^{o}C for 4 months gave the percentage remaining of human insulin of 26.12, 36.86 and 15.17% which were higher than human insulin solution which gave the percentage remaining of 4.26, 3.26 and 5.82%, respectively. The percentage of entrapment of human insulin in this liposomal formulation were at 31.72, 64.10 and 8.10 when kept at 4± 2, 30 ± 2 and 45± 2 ^{o}C, for 4 months, respectively. In addition, this formulation gave no sedimentation or layer separation with an average zeta potential value of 47.7 ± 1.44 mV. This synthesized cationic lipid, CTA can be furture applied for the entrapment of other negatively charged substances, such as genes or anionic drugs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกเพื่อใช้เตรียมไลโปโซม

ผู้เขียน นางสาว ชลดา คำโน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร.อรัญญา มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
	ศ. ดร.จีรเดช มโนสร้อย	กรรมการ
	ศ. ดร.รอล์ฟ จี เวอร์เนอร์	กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ไขมันประจุบวกเพื่อใช้เตรียมไลโป โซม ได้สังเคราะห์ ไขมันประจุบวก cholest-5-en-3-ol(3β)(trimethylammonio)acetate(CTA) จาก cholesterol และ trimethyl glycine ใน dichloromethane และใช้ dimethylaminopyridine (DMAP) และ N,N' dicyclohexyl carbodiimide(DCC) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 40^0ซ ซึ่งปฏิกิริยาเกิดสมบรูณ์ที่ 48 ชั่วโมงและได้เปอร์เซนต์ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 32.22 % ได้นำผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการหาจุดหลอมเหลว, TLC, IR, NMR, LC-MS และ HPLC ส่วนการสังเคาระห์ไขมันประจุบวกตัวอื่นจาก solasodine/cholesterol และ betaine hydrochloride โดยใช้วิธีการเดียวกัน ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการมากและให้เปอร์เซนต์ของผลิตภัณฑ์น้อยมาก จึงได้นำไขมันประจุบวกCTA ที่สังเคราะห์ได้มาทำให้บริสุทธิ์แล้ว เตรียมเป็นไลโปโซม ประจุบวกเปรียบเทียบกับโลโปโซมสูตรต่างๆ ได้เตรียมโลโปโซมโดยใช้เทคนิค chloroform film method ร่วมกับการใช้คลื่นความถี่สูง จำนวน 7 สูตรจาก dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)/cholesterol(Chol)/dimethyldioctadecylammonium bromide(DDAB) ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1, DPPC/Chol/CTA ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1, DPPC/Chol ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:3, DPPC/CTA/ DDAB ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1 และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

DPPC/CTA ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:3, 1:1 และ 1:2 จากนั้นได้นำไปวัดขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เตรียมได้โดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสง ตรวจสอบลักษณะของอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และ หาค่า zeta potential โดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสง พบว่าไลโปโซม เปล่าเพียง 4 สูตร ซึ่งมีความคงตัวทางกายภาพดี โดยไม่ตกตะกอนหลังจากเตรียมได้ 3 เดือนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4± 2, 30 ± 2และ 45± 2°ซ ประกอบด้วย DPPC/Chol/ DDAB ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1, DPPC/Chol/CTA ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1, DPPC/Chol ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:3 และ DPPC/CTA/DDAB ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1 จึงนำไลโปโซมเปล่าทั้ง 4 สูตรมาเก็บกักฮิวแมนอินซูลินที่มีความเข้มข้น 0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เทคนิคการเตรียมแบบทำให้แห้ง (FDEL) แล้วนำไปกระจายตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 หลังการเก็บกักพบว่าไลโปโซมสูตร DPPC/CTA/DDAB ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1 เป็นสูตรที่ดีที่สุดเนื่องจากมีความคงตัวทางกายภาพดีไม่ตกตะกอนหรือแยกชั้นและไม่เปลี่ยนสีเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4± 2 , 30 ± 2 และ 45± 2 °ซ เป็นเวลา 1 เดือน โดยสามารถเก็บกักฮิวแมนอินซูลินที่ใช้เทคนิค gel filtration ด้วย Sepharose CL 6B และ HPLC โดยได้เท่ากับ 62.72% และมีลักษณะอนุภาคเป็นทรงกลม มีลักษณะเป็น unilamellar เมื่อตรวจสอบด้วย TEM ซึ่งมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 2.26±0.87 ไมโครเมตร มีความคงตัวทางเคมีเมื่อเก็บไว้ที่ 4± 2 , 30 ± 2 และ 45± 2 °ซ เป็นเวลา 4 เดือน โดยพบว่ามีปริมาณฮิวแมนอินซูลินเหลือเท่ากับ 26.12, 36.86 และ 15.75% ซึ่งมากกว่าฮิวแมนอินซูลินในรูปสารละลายน้ำซึ่งมีปริมาณฮิวแมนอินซูลินเหลือเท่ากับ 4.86, 3.26 และ 5.82% ตามลำดับ ฮิวแมนอินซูลินมีเปอร์เซนต์การเก็บกักในไลโปโซมสูตรนี้เท่ากับ 31.72, 64.10 และ 8.10%g เมื่อเก็บที่ 4± 2 , 30 ± 2และ 45± 2 °ซ เป็นเวลา 4 เดือน นอกจากนี้ยังไม่พบการตกตะกอนหรือแยกชั้น และมีค่า zeta potential เท่ากับ 47.7±1.44 mV จะสามารถนำไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์ได้ (CTA)ไปเก็บกักสารอื่นที่มีประจุลบเช่นยีนหรือตัวยาที่มีประจุลบได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved