

<b>Thesis Title</b>	Development of Nano-/Microparticles Drug Delivery System for Treatment of Mastitis in Dairy Cows	
<b>Author</b>	Miss WasanaChaisri	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>		
	Assoc. Prof. Dr. SiripornOkonogi	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. WitayaSuriyasathaporn	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. ChadaratAmpasavate	Co-advisor

### ABSTRACT

The aim of the present work was to develop nano-/microparticle drug delivery system of selected model drugs commonly used and effective in dairy cow mastitis treatment.

According to epidemiology study, it was found that most common pathogens in the mastitis cows were environmental streptococci (ES)(13.1%), coagulase-negative staphylococci(CNS) (9.9%), *Corynebacterium* spp. (2.7%), *Staphylococcus aureus*(1.1%) and Enterobacteriaceae (1.5%). Most of isolated microorganisms were susceptible to cephalexin (CPX) and gentamicin (GS). Therefore, CPX and GS were selected as model drugs in the development of nano-/microparticle because of their highly susceptibility to the tested strains and the raw materials are commonly available in Thailand.

For CPX, poly(d,l-lactide-co-glycolide)(PLGA) was firstly used as a carrier. Emulsion solvent evaporation was used as a technique of preparation. Effects of emulsion type and process parameters on microparticles characteristic were investigated. It was found that CPX-loaded PLGA microparticles prepared using a W/O/W double emulsion technology were slightly larger (~ 3-5  $\mu\text{m}$ ) but much higher in drug content (~ 18 % w/w) than those obtained using O/W single emulsion preparation technology (average size was 2  $\mu\text{m}$ , loading efficiency was less than 2 %). The stirring during emulsification and a change in both the internal and external phase of the emulsion affected the size and the drug loading efficiency of the microparticles. A 60/40 v/v mixture of chloroform and acetone was found to be the best organic solvent system for creating the primary emulsion. To obtain microparticles with a desirable size and high drug loading efficiency, a stirring rate of 8,000-10,000 rpm gave the best results. However, the drug loading efficiency was very low (~18%).

To improve drug loading efficiency, CPX-loaded PLGA microparticles were prepared by two different W/O/W emulsion solvent evaporation methods. Several types of surfactants at different concentrations were studied with the selected suitable method. It was found that Tween 80 showed highest drug loading efficiency. CPX existed as noncrystalline state in microparticle. CPX microparticles exhibited good inhibition with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of 128  $\mu\text{g/ml}$  and 2048  $\mu\text{g/ml}$  against *S. aureus* ATCC 25922, 512  $\mu\text{g/ml}$  and 4096  $\mu\text{g/ml}$  against *Escherichia coli* ATCC 25933, respectively.

Regarding to the GS, the nano-/microparticles were firstly prepared by the same technique as CPX microparticles using PLGA and poly(lactic-co-

hydroxymethyl glycolic acid) (PLHMGA) as a carrier. Effects of ethanol, surfactant, osmotic value of the external phase, polymer type and concentration on size, drug loading efficiency and release behavior were investigated. The results demonstrated that neither ethanol nor surfactants had beneficial effects on the drug loading efficiency (around 4-10%). However an increase in buffer concentration (and thus osmotic pressure) of the external phase resulted in a substantial increase of GS loading (from 10 to 28%). Further, an increase of PLGA concentration in dichloromethane from 10% to 15/20% caused a 4-time increase of the drug loading. The best formulation identified in this study had loading efficiency of around 70%. The particles showed a burst release of the drug, followed by a plateau phase of 35 days where hardly any release occurred. The drug was then slowly released for around 25 days likely due to degradation of the microparticles. The drug loading efficiency of GS in PLHMGA was not significantly different from PLGA microparticles (64%). The release of GS from PLHMGA microparticles was faster than that of PLGA because the degradation rate of PLHMGA is more rapid than PLGA.

Further investigation in order to enhance drug loading efficiency was done by using a water soluble *N*-trimethyl chitosan (TMC). Nanoparticles were formed by a complex coacervation between TMC and dextran sulfate (DS). The influence of formulation parameter variables, including concentration of drug and carriers on particle size, zeta potential, and drug loading efficiency was studied. The results demonstrated that size of all formulation ranged between 154-750 nm. Values of drug loading efficiency and zeta potential varied between 18%-69.5% and -50- to -69 mV. Increasing of nanoparticles size was obtained with increasing concentration of GS and carriers. The highest loading efficiency (69.5%) was achieved when the concentration

of GS, and carriers was 0.5 and 1.0 mg/ml respectively. The *in vitro* release of GS from the selected particles approximately 85% was shown in 5 h. The cytotoxicity of obtained nanoparticles was drug independent. The GS-loaded nanoparticles showed antibacterial activity for *S.aureus*, *Streptococcusuberis* and *E. coli* in a dose dependent manner. The antimicrobial activity for *Strep.uberis* of GS-loaded nanoparticles was higher than that the free drug when 400 µg/ml drug concentrations were used.

Form all of these results, it was concluded that CPX and GS nano-/microparticle drug delivery system could be prepared. The obtained formulations possessed antibacterial activity to microorganism causing dairy cow mastitis. It was probably considered as a potential drug delivery system for further use in dairy cow mastitis treatment.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบนำส่งยาอนุภาคนาโน-/ไมโครเพื่อรักษาเต้านมอักเสบในโคนม	
ผู้เขียน	นางสาว วาสนา ไชยศรี	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ศิริพร โอโกโนกิ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร. วิทยา สุริยาสถาพร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเสวค	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบนาโน-/ไมโครพาร์ติเคิลโดยใช้ตัวยาที่นิยมใช้และมีประสิทธิภาพต่อการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม

จากการศึกษาทางระบาดวิทยา พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุด ในโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบคือ Environmental streptococci (ES) (13.1%), Coagulase-negative staphylococci (CNS) (9.9%), *Corynebacterium* spp. (2.7%), *Staphylococcus aureus* (1.1%) และ Enterobacteriaceae (1.5%) โดยเชื้อที่เพาะแยกได้ส่วนใหญ่มีความไวต่อยา cephalexin (CPX) และ gentamicin (GS) ดังนั้นยา CPX และ GS จึงถูกเลือกเป็นยาต้นแบบในการพัฒนานาโน-/ไมโครพาร์ติเคิล เนื่องจากตัวยาทั้งสองมีความไวสูงต่อเชื้อที่ทดสอบและวัตถุดิบสามารถหาได้ในประเทศไทย

สำหรับ CPX, poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) เป็น carrier ตัวแรกที่ถูกใช้เตรียมโดยเทคนิค emulsion solvent evaporation รูปแบบการเตรียม emulsion และปัจจัยของขบวนการเตรียมต่าง ๆ ที่มีผลต่อลักษณะของไมโครพาร์ติเคิลได้ถูกทำการศึกษา ผลการทดลองพบว่าเมื่อเตรียมไมโครพาร์ติเคิลด้วยเทคนิค W/O/W double emulsion อนุภาคจะมีขนาด (3-5  $\mu\text{m}$ ) และการกักเก็บตัวยามากกว่าไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมด้วยเทคนิค O/W single emulsion (~ 18%) นอกจากนี้พบว่า

ความเร็วรอบในการทำ emulsion และการเปลี่ยนชนิดของ internal และ external phase มีผลต่อขนาดและความสามารถในการกักเก็บตัวของอนุภาคที่เตรียมได้พบว่าส่วนผสมของ chloroform และ acetone ในอัตราส่วน 60/40 เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับ primary emulsion ความเร็วรอบในการทำ emulsion ที่ 8,000-10,000 rpm เป็นความเร็วรอบที่ให้ผลดีที่สุดโดยได้อนุภาคที่มีขนาดและความสามารถในการกักเก็บตัวยาเหมาะสมอย่างไรก็ตามความสามารถในการกักเก็บตัวยาที่ได้จากการทดลองนี้ยังต่ำมาก (~ 18%)

เพื่อเพิ่มความสามารถในการกักเก็บตัวยา CPX-loaded microparticle จึงถูกเตรียมโดยวิธี W/O/W double emulsion ที่แตกต่างกัน 2 วิธี ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการกักเก็บตัวยาได้ถูกศึกษา พบว่า Tween 80 ทำให้อนุภาคที่เตรียมได้สามารถกักเก็บตัวยาได้สูงสุด CPX อยู่ในอนุภาคในสถานะ noncrystalline และ CPX ไมโครพาร์ติเคิลแสดงการยับยั้งเชื้อได้ดี โดยมีค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC) ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 คือ 128 µg/ml and 2048 µg/ml และมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 เท่ากับ 512 µg/ml และ 4096 µg/ml ตามลำดับ

สำหรับ GS ไมโครพาร์ติเคิลถูกเตรียมโดยวิธีเดียวกับ CPX ไมโครพาร์ติเคิลโดยใช้ aliphatic polyester 2 ชนิด ได้แก่ PLGA และ poly(lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid) (PLHMGA) เป็น carrier ผลของ ethanol, surfactant, osmotic value ของ external phase ชนิดและความเข้มข้นของ polymer ที่ใช้ต่อขนาด ความสามารถในการกักเก็บตัวยาและความสามารถในการปลดปล่อยตัวยาได้ถูกศึกษา ผลการทดลองพบว่า ethanol และ surfactant ส่งผลต่อความสามารถในการกักเก็บตัวยา (4-10%) ความเข้มข้นของ buffer และ osmotic pressure ของ external phase ที่สูงขึ้นส่งผลให้การกักเก็บตัวยาเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับจาก 10% ถึง 28% นอกจากนี้ ความเข้มข้นของ PLGA ที่เพิ่มขึ้นจาก 10% เป็น 15% และ 20% จะทำให้ความสามารถกักเก็บตัวยาสูงขึ้น 4 เท่า อนุภาคไมโครพาร์ติเคิลที่ดีที่สุดในการทดลองนี้มีการกักเก็บตัวยาสูงสุดประมาณ 70% การปลดปล่อยยาออกอนุภาคในช่วงแรกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (burst release) และไม่มีการปลดปล่อยตัวยาไปจนถึงวันที่ 35 แต่หลังจากนั้นอนุภาคเริ่มมีการปลดปล่อยตัวยาอย่างช้า ๆ อีกประมาณ 25 วัน เนื่องจากการอนุภาคเริ่มมีการสลายตัวเมื่อเปรียบเทียบการกักเก็บตัวยาใน PLHMGA และ PLGA



พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (64%) การปลดปล่อยตัวยาจาก PLHMGA เกิดขึ้นเร็วกว่า PLGA เนื่องจาก PLHMGA มีการสลายตัวเร็วกว่า

การศึกษาต่อไปเพื่อเพิ่มการกักเก็บตัวยา เป็นการเตรียมนาโนพาร์ติเคิลจาก *N*-Trimethyl chitosan (TMC) โดยใช้เทคนิค coacervation ระหว่าง TMC และ dextran sulfate (DS) ศึกษายใน ขบวนการเตรียมนาโนพาร์ติเคิล เช่น ความเข้มข้นของยาและ carrier ต่อลักษณะของอนุภาคที่ เตรียมได้ เช่น ขนาด, zeta potential และการกักเก็บตัวยา ได้ถูกศึกษา ผลการทดลองพบว่าขนาดของ อนุภาคที่เตรียมได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 154-750 นาโนเมตรค่าการกักเก็บตัวยาและ zeta potential อยู่ ในช่วง 18%-69.5% และ -50- ถึง -69 mV ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของยาและ carrier ที่เพิ่มขึ้นมีผลเพิ่มขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้ และเมื่อเตรียมนอนุภาคโดยใช้ความเข้มข้น ของยาและ carrier ที่ 0.5 mg/ml และ 1 mg/ml จะได้อนุภาคที่มีการกักเก็บตัวยามากที่สุด 69.5% ประมาณ 85% ของตัวยาถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคภายใน 5 ชั่วโมงความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่ ขึ้นกับปริมาณตัวยาในอนุภาค นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *Streptococcus uberis* และ *E. coli* โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของยาที่ 400 µg/ml ในอนุภาคนาโนพาร์ติเคิล พบว่ามี ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Strep. uberis* สูงสุด

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าสามารถพัฒนาระบบนำส่งยา CPX และ GS ใน รูปแบบนาโน-/ไมโครพาร์ติเคิล ซึ่งระบบนำส่งยาที่พัฒนาได้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้คืออาจนำไปพิจารณาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบใน โคนมต่อไป