



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่เพื่อเพิ่มการดูดซึมของ
ออลทรานส์เรติโนอิกอะซิดโดยการรับประทาน
**Development of novel microemulsion for oral absorption
enhancement of all trans retinoic acid**

ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุนงกช
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ MRG6080062

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่เพื่อเพิ่มการดูดซึมของ
ออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดโดยการรับประทาน
Development of novel microemulsion for oral absorption
enhancement of all trans retinoic acid

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยบูรพา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6080062

ชื่อโครงการ: การพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่เพื่อเพิ่มการดูดซึมของออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดโดยการรับประทาน

ผู้วิจัย: ผศ.ดร. อธิพิทย์ สุบงกช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

E-mail address: titaniccto@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ที่มีโอเลท-5 เป็นสารลดแรงตึงผิว เพื่อเพิ่มการดูดซึมโดยการรับประทานของออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิด ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ได้รับการประเมินขนาดอนุภาค รูปร่าง ศักย์ゼตา การปลดปล่อย การดูดซึมผ่านลำไส้แบบภายนอกร่างกาย ความเป็นพิษต่อเยื่อบุลำไส้ และความคงตัว ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มีรูปร่างกลม โดยมีขนาดน้อยกว่า 200 นาโนเมตรและมีประจุพื้นผิวเป็นลบ ไมโครอิมัลชันที่มีออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยแบบอันดับศูนย์ ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านลำไส้ของออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสูตรควบคุมซึ่งเป็นรูปแบบสารละลายของยาในน้ำมัน จากการประเมินความเป็นพิษต่อเยื่อบุลำไส้ของไมโครอิมัลชันที่มีออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดพบว่าไม่แตกต่างจากน้ำมันปลา จากการศึกษาความคงตัวพบว่าไมโครอิมัลชันที่มีออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดมีความคงตัวที่ 25 °C มากกว่า 40 °C

คำหลัก: ไมโครอิมัลชัน ออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิด การดูดซึมผ่านทางลำไส้ โอเลท-5

Abstract

Project Code: MRG6080062

Project Title: Development of novel microemulsion for oral absorption enhancement of all trans retinoic acid

Investigator: Assistant Professor Dr. Thirapit Subongkot, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University

E-mail address: titanicto@hotmail.com

Project Period: 2 years

This study aimed to develop a novel microemulsion that contained oleth-5 as a surfactant to enhance the oral absorption of all-*trans* retinoic acid (ATRA). The prepared microemulsion was evaluated for its particle size, shape, zeta potential, *in vitro* release, *in vitro* intestinal absorption, intestinal membrane cytotoxicity and stability. The obtained microemulsion was spherical in shape with a particle size of less than 200 nm and a negative surface charge. The *in vitro* release of the ATRA-loaded microemulsion was best fit with the zero-order model. This microemulsion significantly improved the intestinal absorption of ATRA. Confocal laser scanning microscopy analysis using a fluorescent dye-loaded microemulsion also confirmed the intestinal absorption result. The intestinal membrane cytotoxicity of the ATRA-loaded microemulsion did not differ from an edible oil (fish oil). Stability testing showed that the ATRA-loaded microemulsion was more stable at 25 °C than 40 °C.

Keywords: microemulsion, all-*trans* retinoic acid, oral absorption enhancement, oleth-5

บทคัดย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ชื่อโครงการ: การพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่เพื่อเพิ่มการดูดซึมของออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดโดยการรับประทาน

ผู้วิจัย: ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุนงกษ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

งบประมาณที่ได้รับ: 600,000 บาท

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ที่มีโอเลท-5 เป็นสารลดแรงตึงผิว เพื่อเพิ่มการดูดซึมโดยการรับประทานของออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิด ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ได้รับการประเมินขนาดอนุภาค รูปร่าง ศักย์เซตา การปลดปล่อยยา การดูดซึมผ่านลำไส้แบบภายนอกร่างกาย ความเป็นพิษต่อเยื่อลำไส้ และความคงตัว ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มีรูปร่างกลม โดยมีขนาดเล็กกว่า 200 นาโนเมตรและมีประจุพื้นผิวเป็นลบ ไมโครอิมัลชันที่มีออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยแบบอันดับศูนย์ ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านลำไส้ของออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสูตรควบคุมซึ่งเป็นรูปแบบสารละลายของยาในน้ำมันปลา จากการประเมินความเป็นพิษต่อเยื่อลำไส้ของไมโครอิมัลชันที่มีออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดพบว่าไม่แตกต่างจากน้ำมันปลา จากการศึกษาความคงตัวพบว่าไมโครอิมัลชันที่มีออลทรานส์เรทีโนอิกอะซิดมีความคงตัวที่ 25 °C มากกว่า 40 °C

สารบัญ

หน้า

| | |
|--------------------------------|----|
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา | 1 |
| สารเคมีและเครื่องมือ | 3 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 5 |
| ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง | 10 |
| สรุปผลการวิจัย | 29 |
| เอกสารอ้างอิง | 30 |

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในการตั้งตำรับยาเพื่อนำมาใช้กับผู้ป่วยนั้น การบริหารยาโดยการรับประทานนั้นจัดเป็นรูปแบบที่ได้รับความนิยมสูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่าอุปสรรคของการนำส่งยาคือยาไม่สามารถละลายน้ำได้หรือละลายได้น้อยมาก จึงส่งผลให้เป็นปัญหาในการตั้งสูตรตำรับ ซึ่งยาที่ไม่ละลายนั้น จะไม่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายเพื่อให้ได้ค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ที่เพียงพอต่อการรักษา

ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาชนิดหนึ่งที่มีรายงานการนำมำใช้นำส่งยาทั้งโดยการรับประทาน (oral drug delivery) การฉีด (parenteral delivery) การให้ผ่านทางผิวหนัง (transdermal delivery) และทางดวงตา (ocular delivery) ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ ประกอบด้วยวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม (surfactant/co-surfactant) และวัฏภาคน้ำ (water phase) ไมโครอิมัลชันมีลักษณะใส (transparent) มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร นอกจากนี้ยังเป็นระบบนำส่งยาที่สามารถเตรียมได้ง่าย โดยใช้การไตเตรตวัฏภาคน้ำลงในส่วนผสมของวัฏภาคน้ำมันกับสารลดแรงตึงผิว

All trans retinoic acid (ATRA) จัดเป็นวิตามินเอในรูปกรด มีข้อบ่งใช้สำหรับรักษา acute promyelocytic leukemia โดยกระตุ้นให้เซลล์ leukemia สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ตัวเต็มวัยได้ ในปัจจุบันยา ATRA มีจำหน่ายในรูปแบบ soft gelatin capsules ขนาด 10 mg ในชื่อการค้า Vesanoid ซึ่งจากข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์พบว่า ATRA มีการดูดซึมที่ต่ำ (ค่าเฉลี่ยของระดับยาสูงสุดคือ 347 ± 266 ng/ml) และมีความแปรปรวนในบุคคลเดียวกันและระหว่างบุคคลที่สูง (high inter-patient and intra-patient variation) [1]

ตำรับยา Vesanoid นั้น เป็น ATRA ในรูปแบบสารละลาย (solutions) ในน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) การที่ตัวยาสำคัญจะถูกดูดซึมได้นั้นจึงจำเป็นต้องมีน้ำดี (bile) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวตามธรรมชาติ

ในการทำให้เกิด coarse emulsion ก่อน อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำดีที่หลั่งออกมาในแต่ละคนหรือแม้กระทั่งในคนเดียวแต่ต่างเวลากันย่อมมีความแตกต่าง การดูดซึม Vesanoid ของแต่ละบุคคลจึงย่อมมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของระดับยา ATRA ในเลือดของแต่ละบุคคลในที่สุด

การที่ยาจะสามารถถูกดูดซึมได้ดีโดยการรับประทานนั้น นอกจากตัวยาก็จะต้องละลายในตัวทำละลายได้ดีแล้ว ตัวยาก็ควรมีค่า log partition coefficient อยู่ระหว่าง 1 ถึง 3 ด้วย จากคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของ ATRA พบว่า ATRA มีค่าการละลายน้ำที่ต่ำมาก ($0.19 \mu\text{g/ml}$) [2] และมีค่า log P เท่ากับ 6.3 [3] ด้วยเหตุนี้ ATRA จึงมีการดูดซึมที่ต่ำ

ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาชนิดที่เป็นคอลลอยด์ (colloidal drug delivery system) ประกอบไปด้วยวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม และวัฏภาคน้ำ ไมโครอิมัลชันจัดเป็นความคงตัวของเทอร์โมไดนามิกส์ มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร และสามารถบรรจุยาทั้งที่ละลายไขมันดีและละลายน้ำได้ดี มีงานวิจัยที่นำไมโครอิมัลชันมาเป็นระบบนำส่งยาประเภทต่างๆ อยู่มากมาย เช่น ระบบนำส่งยาโดยการรับประทาน (oral drug delivery system) [4] ระบบนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง (transdermal drug delivery system) [5] ยาฉีด (parenteral drug delivery) [6] และระบบนำส่งยาผ่านดวงตา (ocular drug delivery) [7]

ในประเทศไทยนั้น ยังไม่มียาสามัญของ ATRA แต่อย่างใด จึงจำเป็นต้องนำเข้า Vesanoid จากต่างประเทศเพื่อมาใช้รักษาผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยที่ไม่มีสิทธิการรักษาที่มีภาระค่าใช้จ่ายสูงและประเทศต้องสูญเสียงบประมาณไปกับการนำเข้ายาที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนา ATRA ในรูปแบบไมโครอิมัลชัน เพื่อนำส่งในรูปแบบการรับประทาน โดยเลือกใช้วัฏภาคน้ำมันที่มาจากธรรมชาติ คือ น้ำมันปลา (fish oil) เพื่อให้สามารถนำไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ไปประยุกต์ใช้กับทั้งการนำส่งโดยการรับประทาน (oral route) ได้อย่างปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

2. สารเคมีและเครื่องมือ

2.1 สารเคมี

- 1) Fish oil
- 2) Ethoxydiglycol (Transcutol P)
- 3) Propylene glycol
- 4) Apricot kernel oil PEG-6 esters (Labrafil® M1944CS)
- 5) Absolute ethanol (Merck)
- 6) Oleth-5 (Eumulgin O5)
- 7) PEG-7 glyceryl cocoate (Cetiol HE)
- 8) Tween 20
- 9) Tween 80
- 10) All trans retinoic acid (Jiangxi Hengxiang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Jiangxi, China)
- 11) All trans retinoic acid (Sigma)
- 12) Acetonitrile gradient grade for HPLC (Sigma)
- 13) 2-propanol (isopropyl alcohol) (RCI labscan, Thailand)
- 14) Glacial acetic acid (Merck)

2.2 เครื่องมือ

- 1) Dynamic Light Scattering particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instrument, Worcestershire, UK)
- 2) TEM (Philips Tecnai 20, FEI/Philips Electron Optics, Eindhoven, Netherlands)

- 3) Magnetic stirrer (IKA R0 10, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
- 4) Centrifuge (Sorvall™ Legend™ XT/XF Centrifuge, Thermo Scientific™, MA, USA)
- 5) HPLC (Agilent 1260 infinity II LC systems, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การหาค่าการละลายของ ATRA

การศึกษาค่าการละลายของ ATRA ทำเพื่อเลือกส่วนผสมที่จะใช้ในสูตรตำรับ โดยศึกษาค่าการละลายของ ATRA ในวัฏภาคน้ำมัน คือ fish oil และสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ apricot kernel oil PEG-6 esters (Labrafil® M1944CS), ethanol, oleth-5, PEG-7 glyceryl cocoate, ethoxydiglycol, propylene glycol, Tween 20, Tween 80 และ การหาค่าการละลายทำโดยเติมยาปริมาณมากลงในสารดังกล่าว ปริมาณ 2 ml ที่บรรจุในขวดสีชา จากนั้นจึงคนด้วย magnetic stirrer ที่ 800 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำสารแขวนตะกอนของตัวยาที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 25 °C จากนั้นดูดเฉพาะส่วนบน (supernatant) ไปเจือจางด้วย isopropyl alcohol แล้ววิเคราะห์โดยใช้ HPLC

3.2 การเตรียมไมโครอิมัลชัน

3.2.1 การเลือกสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

เพื่อให้ได้ pseudo-ternary phase diagram ที่มีพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันกว้างที่สุด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อหาชนิดของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้วัฏภาคน้ำมันเป็น fish oil และใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น ethanol กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1 ส่วนการสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ทำโดยใช้ water titration method เมื่อได้ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ให้พื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันสูงสุดแล้ว จึงหาชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) ที่ให้พื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันสูงที่สุดต่อไป โดยใช้วิธีการข้างต้นและกำหนดอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น 1:1

3.2.2 การสร้าง pseudo-ternary phase diagram ของไมโครอิมัลชัน

ซึ่ง surfactant และ co-surfactant ผสมให้เข้ากัน จะได้ส่วนผสมที่เรียกว่า surfactant mixture (Sm) จากนั้นจึงผสม oil phase และ Sm ให้เข้ากัน โดยที่อัตราส่วนของ oil phase และ Sm มีค่าตั้งแต่ 9:1 ถึง 1:9 w/w จากนั้นจึงหยดน้ำกลั่นลงในของผสมดังกล่าวที่คนโดย magnetic stirrer จากนั้นจึงสังเกตความใส (transparency) และบันทึกปริมาณน้ำที่มากที่สุด ที่ยังทำให้ของผสมยังคงมีลักษณะใส โดยของผสมระหว่าง oil phase, Sm และน้ำ ที่ยังมีลักษณะใส จัดเป็นไมโครอิมัลชัน

3.2.3 การหาค่าการละลายของ ATRA ในไมโครอิมัลชัน

ซึ่งยา ATRA ในปริมาณมาก ลงในไมโครอิมัลชัน แล้วคนโดยใช้ magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารแขวนตะกอนที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 25 °C จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใส (supernatant) ไปเจือจางด้วย isopropyl alcohol แล้ววิเคราะห์โดยใช้ HPLC

3.2.4 การเตรียม ATRA loaded microemulsion

เมื่อได้ pseudo-ternary phase diagrams ที่แสดงขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันแล้ว จึงเลือกจุดจากเฟสไดอะแกรมเพื่อเตรียมไมโครอิมัลชัน โดยเลือกสูตรที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 20-200 nm และไม่มี การแยกเฟส การเตรียมไมโครอิมัลชันทำโดยผสมวฏฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำ คนผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer จากนั้นจึงผสม ATRA ลงไป คนต่อไปจนเกิดการละลาย สมบูรณ์

3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของไมโครอิมัลชัน

3.3.1. การวัดขนาดอนุภาค (Mean droplet size) ประจุพื้นผิว (surface charge) การกระจายขนาด (size distribution) และค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)

วัดขนาดอนุภาคของ ATRA loaded microemulsion ประจุที่พื้นผิว (zeta potential) การกระจายขนาด ค่าการนำไฟฟ้าของ ATRA loaded microemulsions โดยใช้ Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analyzer ที่มี 4 mW He–Ne laser ที่มุม 173°

3.3.2. การดูรูปร่างและวัดขนาดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscopy)

หยด ATRA loaded microemulsion ลงบนกริดทองแดงที่เคลือบด้วย formvar จากนั้นซับส่วนเกินโดยใช้กระดาษทิชชู เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้ว จึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านที่ 80 kV

3.4 การศึกษาการปลดปล่อยยาแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* drug release)

ศึกษาการปลดปล่อย ATRA จากไมโครอิมัลชัน ของสูตรตำรับ ME 1 ME 6 และ ME 8 โดยใช้ Dialysis bag ที่มี molecular weight cut off ระหว่าง 6,000-8,000 ดาลตัน โดยนำ ATRA loaded microemulsion ปริมาณ 4 ml ใส่ลงใน dialysis bag แล้วจึงปิดส่วนบนและล่างโดย clamp จากนั้นใส่ลงในขวดแก้ว แล้วเติม release medium ซึ่งเป็น 50 % v/v ethanol:PBS ปริมาณ 80 ml แล้วคนด้วย magnetic stirrer ที่ 300 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเมื่อครบเวลาที่ 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 8 ชั่วโมง 10 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง จึงเก็บ release medium ครั้งละ 1 ml แล้วรีบเติม 50 % v/v ethanol:PBS แทนที่ลงไป นำ release medium ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ ATRA โดย HPLC จากนั้นจึง plot กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและ % cumulative drug release โดยหาจลนศาสตร์การปลดปล่อยจากสมการ

$$C_t = C_o - K_0 t \text{ for zero-order kinetics}$$

$$\text{LogCt} = \text{logCo} - K_1 t / 2.303 \text{ for first-order kinetics}$$

$$Q = K_h t^{1/2} \text{ for Higuchi diffusion model}$$

เมื่อ Q คือปริมาณยาที่ปลดปล่อย และ t คือเวลา และ K คือค่าคงที่

3.5 การศึกษาการดูดซึมผ่านลำไส้แบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* intestinal absorption study)

การศึกษาการดูดซึมโดยการรับประทานแบบภายนอกร่างกายของ ATRA-loaded microemulsion และสูตรควบคุม (ATRA in fish oil) ทำโดยใช้ Franz diffusion cells โดยมีลำไส้เล็กของหนู (ileum) เป็นเยื่อกั้นการแพร่ผ่าน ลำไส้เล็กถูกตัดและล้างส่วนอาหารที่ตกค้างโดย PBS ในส่วน receiver compartment บรรจุด้วย 6.5 ml of 50 % v/v ethanol in PBS (pH 7.4) และคนด้วย magnetic bar โดย diffusion cells จะต่อกับ circulating water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ในส่วนของ donor จะเติมสูตรตำรับที่ต้องการทดสอบในปริมาณ 2 ml จากนั้นจึงสู่ม receiver medium ที่เวลา 1, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง แล้วทดแทนด้วย medium ในปริมาณเท่ากัน ความเข้มข้นของ ATRA ในตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ปริมาณโดย HPLC ปริมาณ ATRA สะสมจะนำไปพล็อตกราฟเทียบกับเวลา แล้วหาค่า apparent permeability (P_{app}) จากสมการ

$$P_{app} = dQ/dt \times [1/(A \times C_0)]$$

เมื่อ dQ/dt คือ linear appearance rate ของ ATRA ใน receiver compartment, A คือพื้นที่ผิวของลำไส้ที่

สัมผัสไมโครอิมัลชัน และ C_0 คือความเข้มข้นของ ATRA ในสูตรตำรับ

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณของ ATRA โดยใช้ HPLC

3.6.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ ATRA (ATRA standard curve)

ซึ่งสารมาตรฐานของ ATRA ปริมาณ 25 mg ลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรด้วย isopropyl alcohol จนครบ 25 ml จะได้ ATRA ความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นนำไปเจือจางจนได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 µg/ml จนถึง 500 µg/ml และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.6.2 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

ใช้ C18 reversed phase column (Symmetry[®], VertiSep[™], Vertical, Nonthaburi, Thailand) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 µm ขนาด 4.6 x 250 mm ส่วน mobile phase ประกอบด้วย acetonitrile:water:glacial acetic acid ในอัตราส่วน 84.5%:15.0%:0.5% (v/v/v) ใช้ UV detector ที่ 353 nm ฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 µl อัตราการไหลของ mobile phase คือ 1.5 ml/min

3.7 การวิเคราะห์โดยใช้สถิติ

ใช้ Analysis of variance (one way ANOVA) ตามด้วย post hoc test โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p -value น้อยกว่า 0.05

4. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การหาค่าการละลายของ ATRA

เนื่องจาก ATRA เป็นยาที่แทบจะไม่ละลายน้ำ จึงจำเป็นต้องศึกษาค่าการละลายเพื่อเลือกสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่สามารถละลาย ATRA ได้ดี โดยค่าการละลายของ ATRA ใน fish oil เท่ากับ 1.63 ± 0.01 mg/ml และค่าการละลายของ ATRA ในสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าการละลายของ ATRA ในสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

| Surfactants/co-surfactants | Solubility (mg/ml) |
|---|--------------------|
| Oleth-5 (Eumulgin 05) | 18.88 ± 0.18 |
| Transcutol P | 18.53 ± 0.08 |
| PEG-7 glyceryl cocoate (Cetiol HE) | 11.46 ± 0.03 |
| Tween 20 | 11.71 ± 0.01 |
| Tween 80 | 12.67 ± 0.09 |
| Ethanol | 7.44 ± 0.02 |
| Apricot kernel oil PEG-6 esters (Labrafil M 1944CS) | 6.11 ± 0.03 |
| Propylene glycol | 0.811 ± 0.002 |

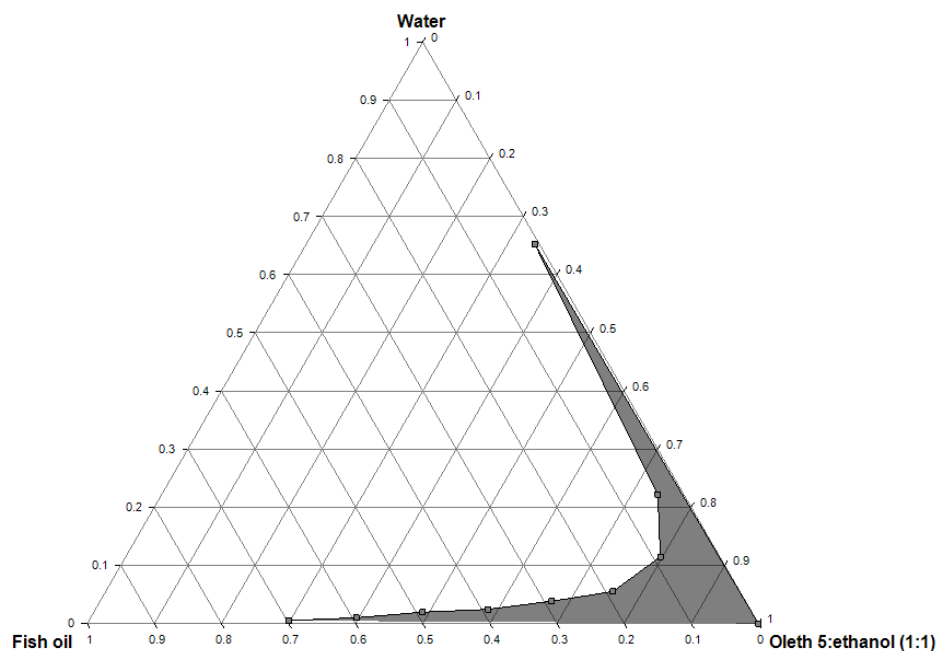
Each value represents mean \pm SD (n=3).

4.2 การเตรียมไมโครอิมัลชัน

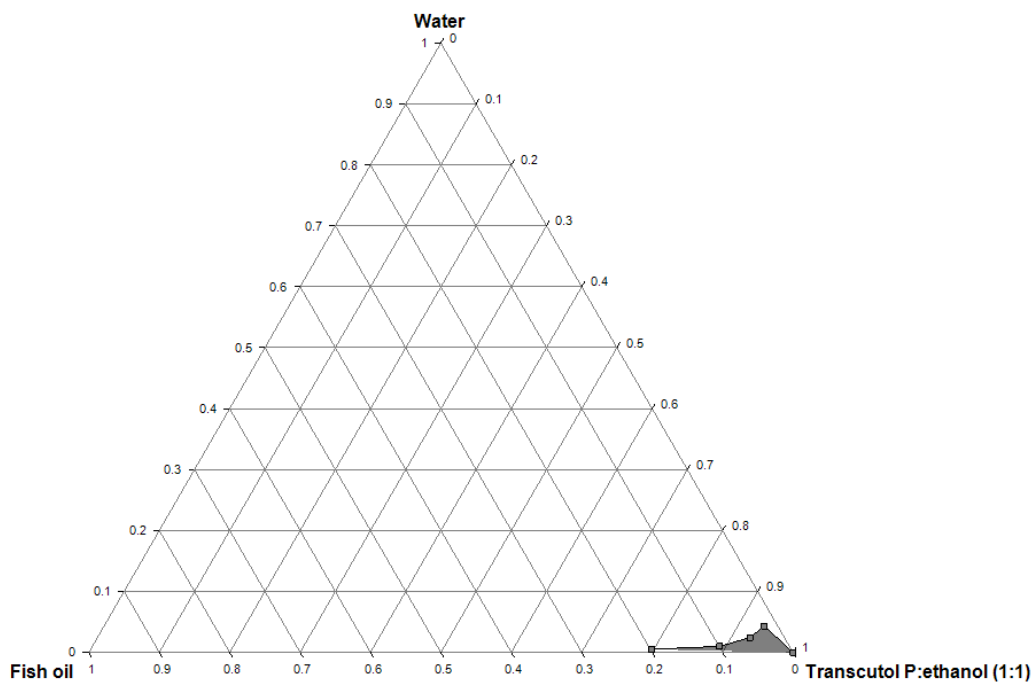
4.2.1 การเลือกสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

เพื่อให้ได้ pseudoternary phase diagrams ที่มีขนาดมากที่สุด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสม

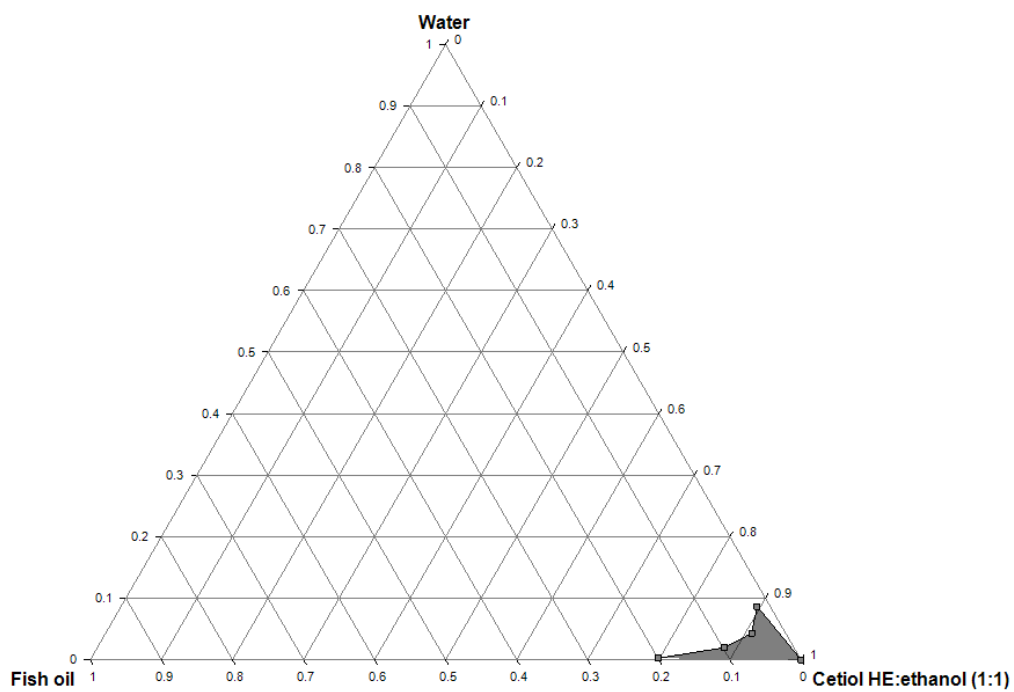
สำหรับการเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม จะใช้ fish oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน ใช้ ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมและน้ำ RO เป็นวัฏภาคน้ำ โดยกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1 ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการศึกษาจะต้องให้ค่าการละลายของ ATRA ไม่น้อยกว่า 7 mg/ml ซึ่งได้แก่ oleth-5 (Eumulgin O5) Ethoxydiglycol (Transcutol P) PEG-7 Glyceryl Cocoate (Cetiol HE) Tween 20 Tween 80 และ ethanol ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 1-5 บริเวณสีเทา (shed area) คือบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชัน



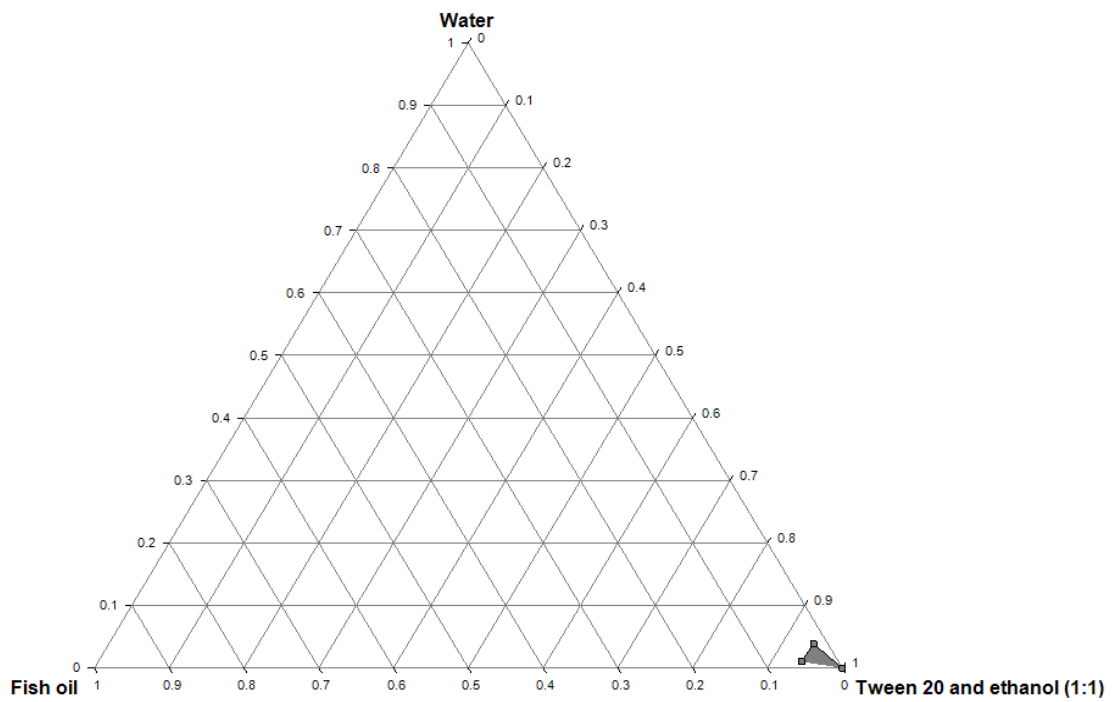
รูปที่ 1 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:ethanol (1:1) and water



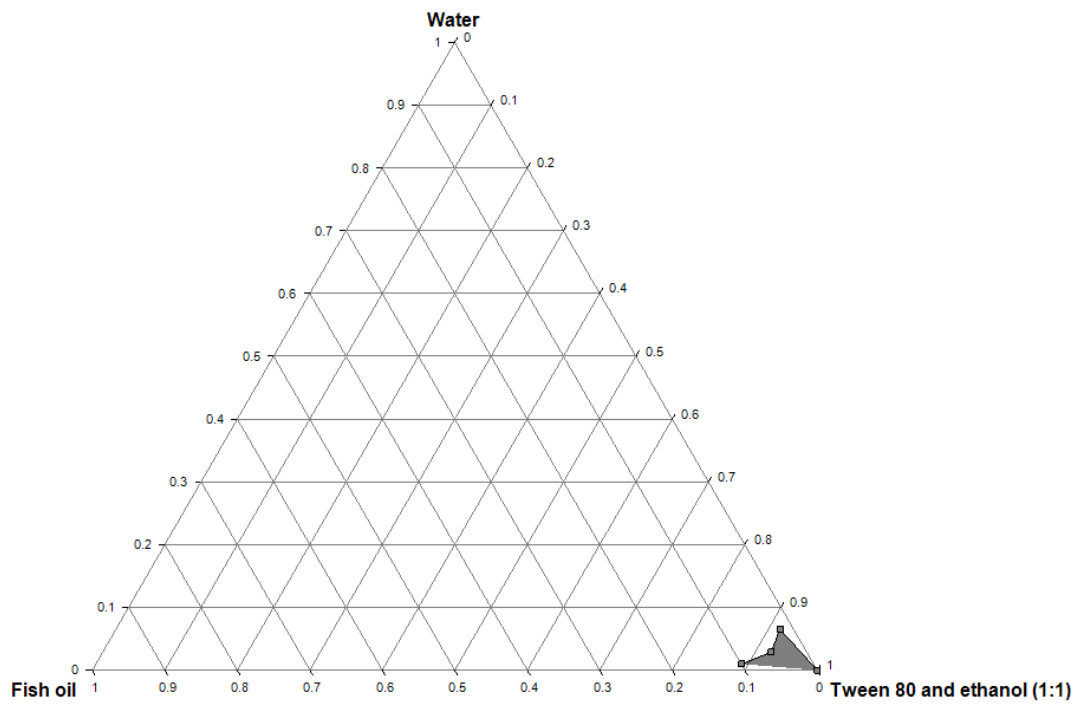
รูปที่ 2 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, Transcutol P:ethanol (1:1) and water



รูปที่ 3 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, Cetiol HE:ethanol (1:1) and water



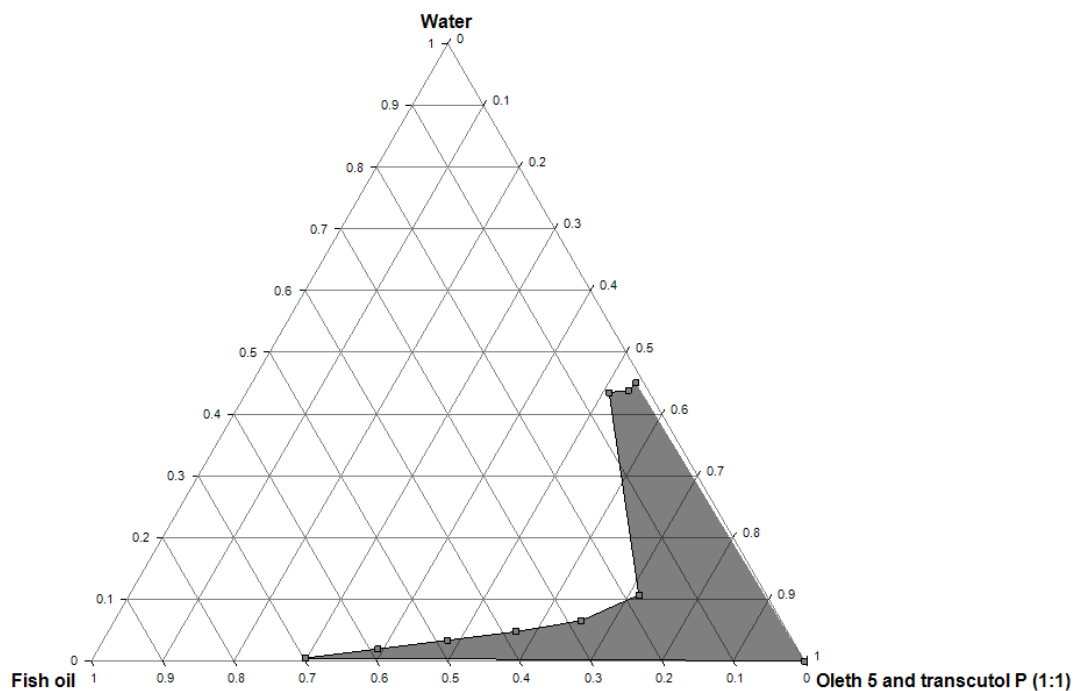
រូប ៤ Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, Tween 20:ethanol (1:1) and water



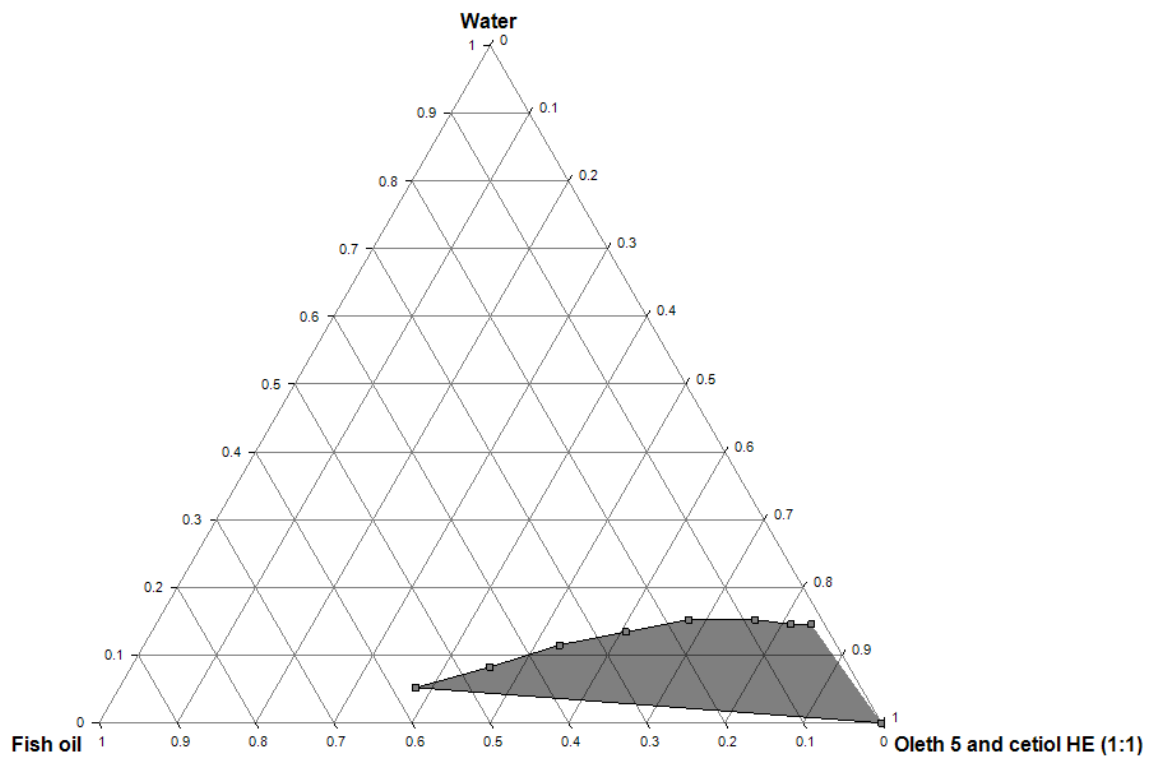
រូប ៥ Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, Tween 80:ethanol (1:1) and water

พบว่าระบบที่ประกอบด้วย fish oil, oleth-5:ethanol (1:1) และน้ำ (รูปที่ 1) ได้พื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงเลือกระบบไมโครอิมัลชันที่มี oleth-5 เป็นสารลดแรงตึงผิว ไปศึกษาต่อ

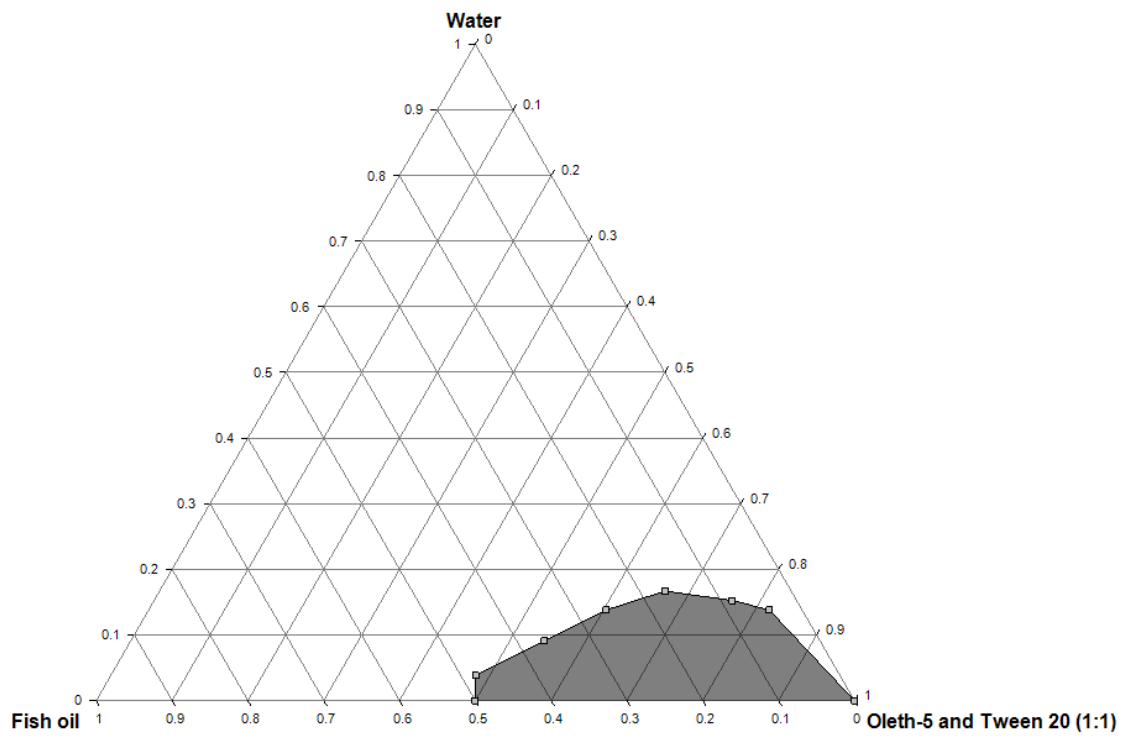
สำหรับการเลือกสารลดแรงตึงผิวรวม จะใช้ไมโครอิมัลชันที่มี fish oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน oleth-5 เป็นสารลดแรงตึงผิว RO water เป็นวัฏภาคน้ำ โดยมี Transcutol P, Cetiol HE, Tween 20 และ Tween 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม



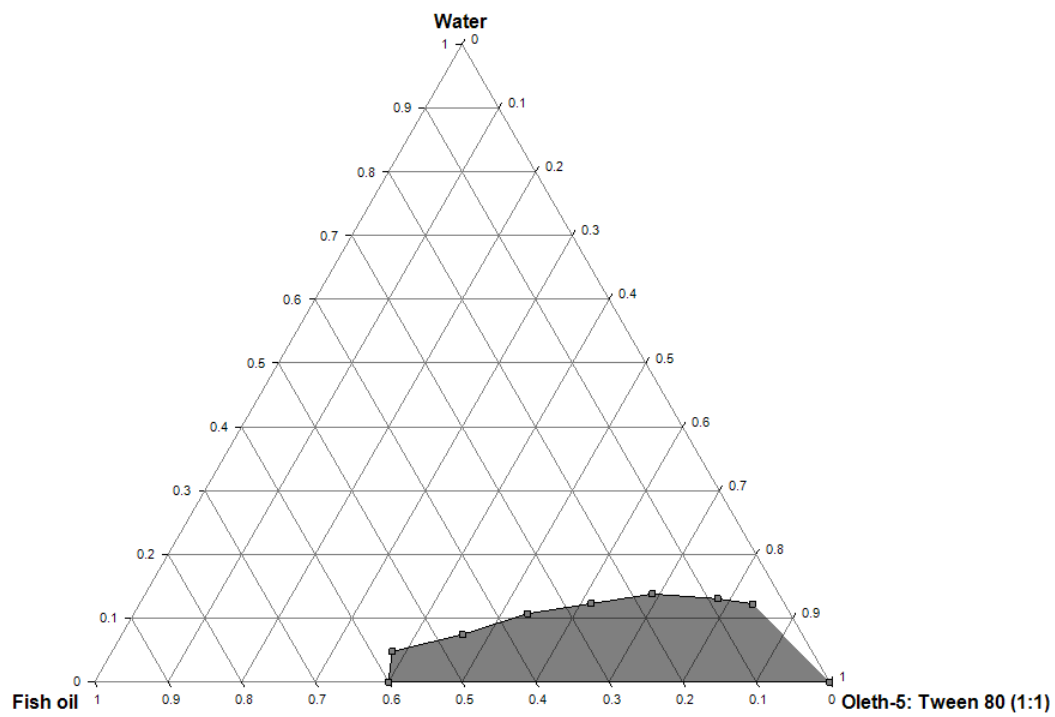
รูปที่ 6 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:Transcutol P (1:1) and water



รูปที่ 7 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:cetiol HE (1:1) and water



รูปที่ 8 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:Tween 20 (1:1) and water

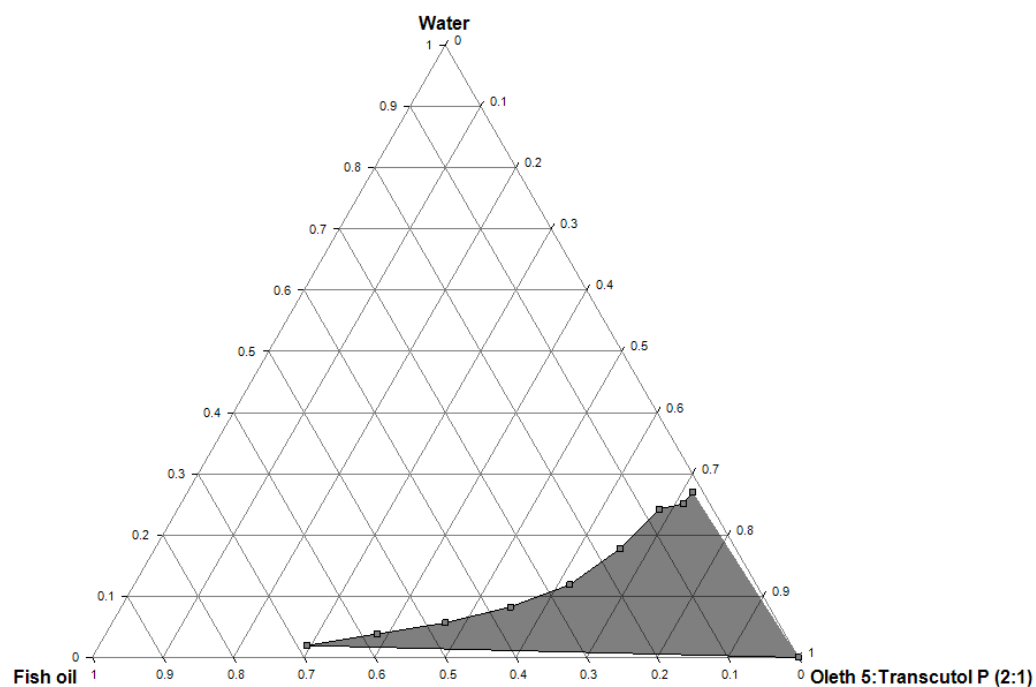


รูปที่ 9 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:Tween 80 (1:1) and water

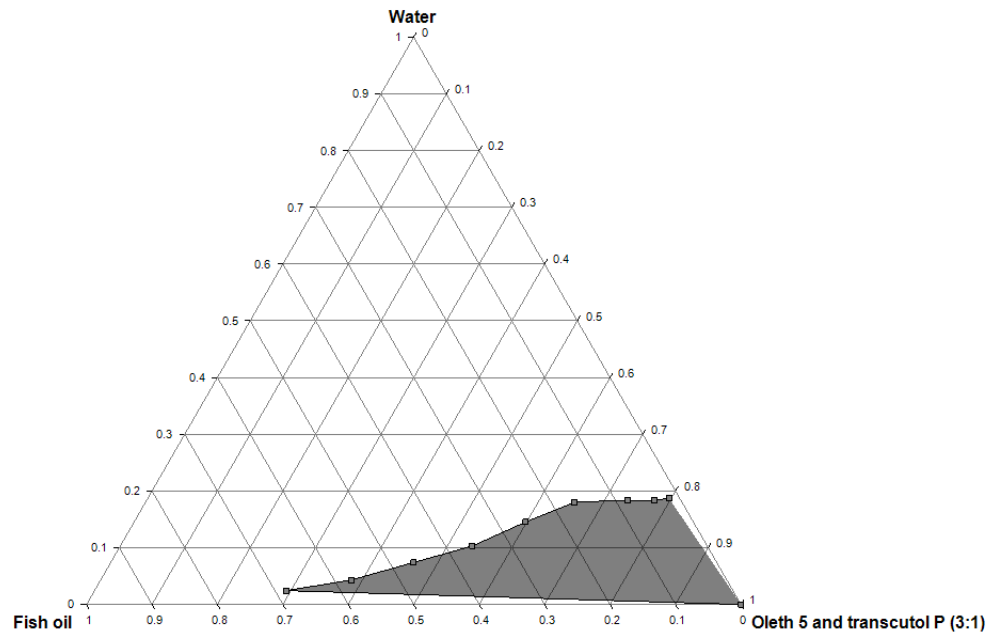
พบว่าไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย oleth-5:Transcutol P (1:1) เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ให้พื้นที่ของไมโครอิมัลชันมากกว่า oleth-5:cetiol HE (1:1) ดังนั้นจึงเลือกใช้ oleth-5 และ Transcutol P เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในการศึกษาต่อไป

4.2.2 การสร้าง pseudo-ternary phase diagrams

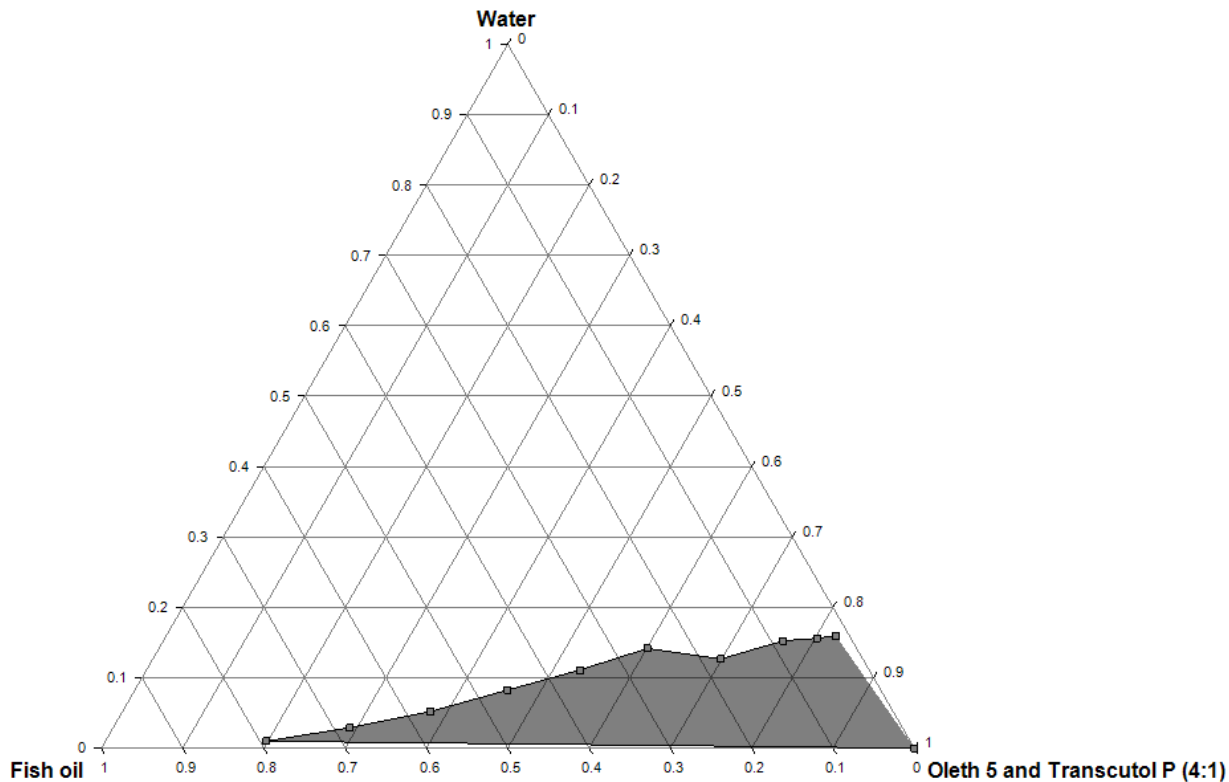
ในการศึกษานี้ pseudo-ternary phase diagrams ประกอบด้วย fish oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน oleth-5 เป็นสารลดแรงตึงผิว Transcutol P เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม และ RO water เป็นวัฏภาคน้ำ โดยกำหนดอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1, 2:1, 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ โดย RO water ถูกหยดลงในของผสมระหว่างวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม พื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันแสดงดังในรูปที่ 10-12



รูปที่ 10 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:Transcutol P (2:1) and water



រូប ៧ ១១ Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:Transcutol P (3:1) and water



รูปที่ 12 Pseudo-ternary phase diagram of fish oil, oleth-5:Transcutol P (4:1) and water

การเพิ่มอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม จาก 1:1 เป็น 2:1, 3:1 และ 4:1 ดังแสดงในรูปที่ 6 รูปที่ 10 รูปที่ 11 และ รูปที่ 12 ตามลำดับนั้น ไม่สามารถเพิ่มพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันได้ โดยพบว่าอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวรวมเท่ากับ 1:1 ให้พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด

ดังนั้นไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย fish oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน oleth-5 เป็นสารลดแรงตึงผิว Transcutol P เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม (อัตราส่วนระหว่าง oleth-5:Transcutol P เท่ากับ 1:1) และ RO water เป็นวัฏภาคน้ำ จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป โดยจะเลือกอัตราส่วนซึ่งให้ไมโครอิมัลชันที่มีขนาดไม่เกิน 200 nm และมีความคงตัวดี ซึ่งอัตราส่วนที่เลือกใช้เพื่อศึกษาต่อแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สูตรตำรับไมโครอิมัลชัน ค่าการละลายของ ATRA และปริมาณของ ATRA ในสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน

| Formulations | Ratio | | | Solubility of ATRA (mg/ml) | ATRA loaded in microemulsion (mg/ml) |
|--------------|-------|--------------------|-------|----------------------------|--------------------------------------|
| | Oil | Surfactant mixture | Water | | |
| ME 1 | 10 | 75 | 15 | 11.06±0.02* | 10 |
| ME 2 | 5 | 80 | 15 | 12.45±1.49* | 11 |
| ME 3 | 15 | 75 | 10 | 15.39±0.49* | 14 |
| ME 4 | 5 | 90 | 5 | 20.71±1.84* | 18 |

^aSurfactant:co-surfactant ratio =1:1 w/w

*Each value represents the mean±standard deviation (n=3).

4.2.3 การศึกษาค่าการละลายของ ATRA ในไมโครอิมัลชัน

ค่าการละลายของ ATRA ในไมโครอิมัลชัน อยู่ระหว่าง 11.06 ถึง 20.71 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ surfactant mixture (oleth-5:Transcutol P (1:1)) ค่าการละลายของ ATRA เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3 ขนาดอนุภาค ประจุที่พื้นผิว การกระจายขนาดและค่าการนำไฟฟ้าของไมโครอิมัลชันสูตรต่างๆ

| Formulations | Particle size (nm) | | Zeta potential (mV) | | PDI | | Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | |
|--------------|--------------------|------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--|----------------|
| | Blank ME | ATRA loaded ME | Blank ME | ATRA loaded ME | Blank ME | ATRA loaded ME | Blank ME | ATRA loaded ME |
| ME 1 | 102.05 \pm 38.36 | 177.9 \pm 23.5 | 0.14 \pm 0.13 | - 0.04 \pm 0.21 | 0.292 \pm 0.057 | 0.28 \pm 0.03 | 75 \pm 2 | 61 \pm 1 |
| ME 2 | 38.1 \pm 2.4 | 42.18 \pm 2.65 | 0.10 \pm 0.06 | - 0.08 \pm 0.03 | 0.35 \pm 0.02 | 0.345 \pm 0.05 | 87 \pm 2 | 70 \pm 1 |
| ME 3 | 92.29 \pm 15.69 | 104.9 \pm 34.9 | 0.087 \pm 0.231 | - 0.0075 \pm 0.3704 | 0.387 \pm 0.074 | 0.318 \pm 0.107 | 51 \pm 3 | 47 \pm 5 |
| ME 4 | 39.81 \pm 32.16 | 167.7 \pm 30.1 | 0.10 \pm 0.05 | - 0.26 \pm 0.15 | 0.313 \pm 0.123 | 0.531 \pm 0.034 | 35 \pm 1 | 38 \pm 4 |

Each value represents mean \pm SD (n=3).

4.3 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของไมโครอิมัลชัน

4.3.1 การวัดขนาดอนุภาค (Mean droplet size) ประจุพื้นผิว (surface charge) การกระจายขนาด (size distribution) และค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)

การศึกษาคุณสมบัติของไมโครอิมัลชันนี้จะศึกษาทั้งไมโครอิมัลชันที่ไม่มี ATRA (Blank microemulsion) และไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ATRA (ATRA loaded microemulsion)

4.3.1.1 ขนาดของอนุภาค

จากการศึกษาขนาดโดยใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) พบว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันที่ไม่มี ATRA มีขนาดอยู่ในช่วง 38.1-102.05 nm ในขณะที่ไมโครอิมัลชันที่มี ATRA มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 42.18-177.9 nm

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเฉพาะไมโครอิมัลชันที่ไม่มี ATRA (Blank microemulsion) เท่านั้น ที่การเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิว ส่งผลให้ไมโครอิมัลชันมีขนาดอนุภาคที่เล็กลง และการบรรจุ ATRA ส่งผลให้ไมโครอิมัลชันมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นได้ ดังตารางที่ 3

4.3.1.2 ประจุพื้นผิว

ในไมโครอิมัลชันที่ไม่มีการบรรจุ ATRA พบว่าประจุพื้นผิว (zeta potential) มีค่าเป็นกลาง แต่เมื่อมี ATRA ในไมโครอิมัลชันพบว่าอนุภาคมีประจุเป็นลบ เนื่องจาก ATRA ในโครงสร้างมีหมู่ carboxylic อยู่ จึงมีความเป็นกรดอ่อน ($pK_a = 4.2$) [8] ในสภาวะที่เป็นกลางของไมโครอิมัลชัน ($pH = 7$) หมู่ carboxylic ในโครงสร้างจึงแตกตัวและทำให้อนุภาคมีประจุเป็นลบในที่สุด

4.3.1.3 การกระจายขนาด

อนุภาคของไมโครอิมัลชันที่ไม่มี ATRA มีการกระจายขนาด (PDI) อยู่ระหว่าง 0.292 – 0.387 ส่วนอนุภาคของไมโครอิมัลชันที่มี ATRA มีการกระจายขนาด (PDI) อยู่ระหว่าง 0.28 – 0.53

4.3.1.4 ค่าการนำไฟฟ้า

ค่าการนำไฟฟ้าเป็นสิ่งที่สามารถนำมาใช้บอกถึงชนิดของไมโครอิมัลชันได้ (oil in water, bicontinuous หรือ water in oil microemulsion)

ในการวิจัยนี้การประเมินชนิดของไมโครอิมัลชันจะพิจารณาจากอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมันและน้ำตามด้วยค่าการนำไฟฟ้า โดยหากอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมันมากกว่าของวัฏภาคน้ำ จะเป็นชนิด water-in-oil microemulsion หากอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมีมากกว่าวัฏภาคน้ำมันและค่าการนำไฟฟ้ามีค่ามากกว่า 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ จะเป็นชนิด oil-in-water microemulsion และเป็นชนิด bicontinuous microemulsion เมื่ออัตราส่วนของวัฏภาคน้ำเท่ากับวัฏภาคน้ำมัน หรือเมื่ออัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมีมากกว่าวัฏภาคน้ำมันและมีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$

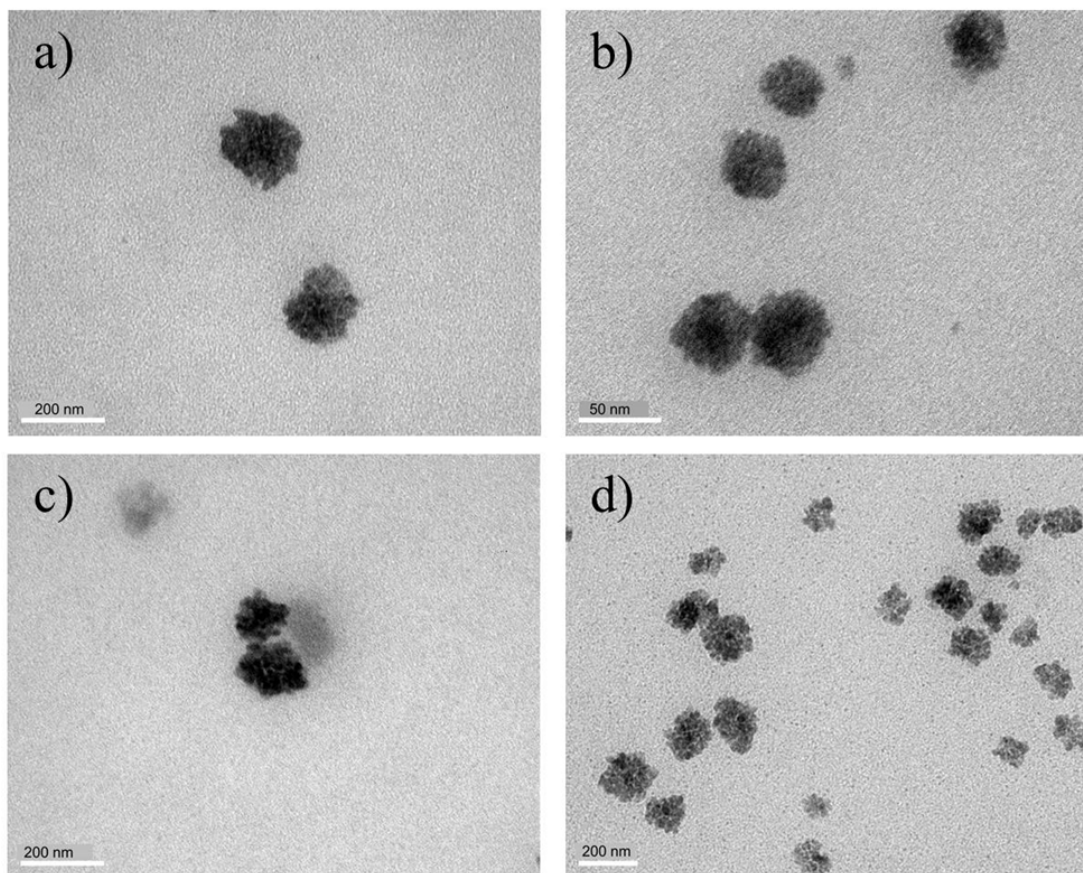
ค่าการนำไฟฟ้าของ blank microemulsion อยู่ในช่วง 35 to 87 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ขณะที่ ATRA-loaded microemulsion อยู่ในช่วง 38 to 70 $\mu\text{S}/\text{cm}$ จากเกณฑ์ข้างต้น จึงสันนิษฐานว่า blank ME 1, ATRA-loaded ME 1, blank ME 2 และ ATRA-loaded ME 2 เป็น oil-in-water microemulsion

Blank ME 3 และ ATRA-loaded ME 3 จัดเป็น water-in-oil microemulsion ส่วน Blank ME 4 จัดเป็น bicontinuous microemulsion แม้ว่า ATRA-loaded ME 4 มีสัดส่วนของวัฏภาคน้ำเท่ากับวัฏภาคน้ำมัน แต่เนื่องจากมีตัวยาละลายไขมันดีมากในสูตรตำรับ และพบว่าอนุภาคที่ได้มีทรงกลมดั่งสังเกตได้จากรูป TEM (รูปที่ 13 d)) ดังนั้น ATRA-loaded ME 4 จึงเป็น water-in-oil microemulsion

4.3.2 การดูรูปร่างและวัดขนาดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

ภาพถ่าย TEM ของสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน (ME 1-ME 4) มีรูปร่างกลมดังแสดงในรูปที่ 13 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ ATRA-loaded ME 1, ATRA-loaded ME 2, ATRA-loaded ME 3 และ ATRA-loaded ME 4 คือ 186.55 ± 10.68 , 44.73 ± 4.29 , 112.31 ± 6.46 , 165.98 ± 14.56 nm ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคจากการวัดด้วยวิธี dynamic light scattering กับ TEM technique ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



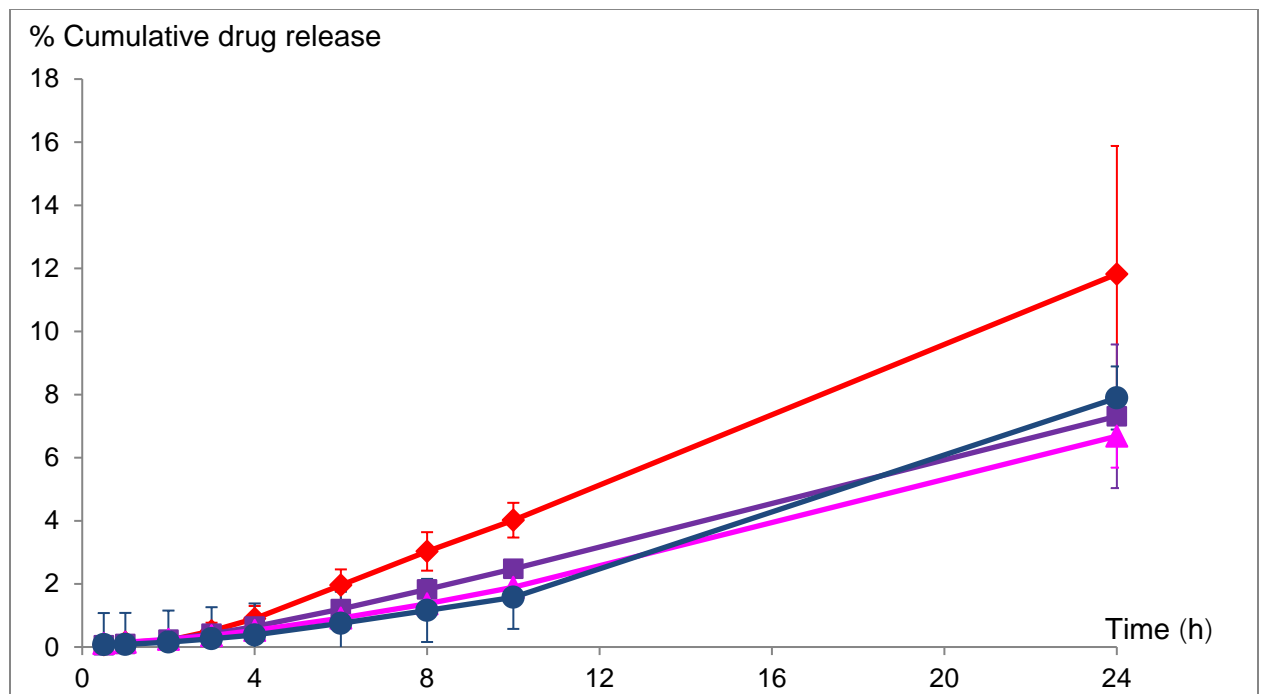
รูปที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านของ ATRA-loaded ME 1, ATRA-loaded ME 2, ATRA-loaded ME 3 และ ATRA-loaded ME 4

4.4 การศึกษาการปลดปล่อยยาแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* drug release)

จากการทดสอบการปลดปล่อยยา ATRA จาก ME 1 – ME 4 พบว่ารูปแบบการปลดปล่อยยา ATRA จาก ME 1 - ME 4 เป็นจลนศาสตร์อันดับศูนย์ (zero order kinetic) ดังแสดงในตารางที่ 4 และ รูปที่ 21 พบว่าอัตราการปลดปล่อยของ ME 1 มีมากกว่า ME 3 and ME 4 อย่างมีนัยสำคัญ อัตราการปลดปล่อยของ ME 1 ไม่แตกต่างจาก ME 2 อย่างมีนัยสำคัญ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอัตราการปลดปล่อยของ ME 3 และ ME 4

ตารางที่ 4 จลนศาสตร์ของการปลดปล่อยยา ATRA จาก ME 1, ME 2, ME 3 และ ME 4

| Release kinetics | ME 1 | ME 2 | ME 3 | ME 4 |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Zero order R^2 | 0.9745±0.0268 | 0.9428±0.0239 | 0.9893±0.0075 | 0.9720±0.0006 |
| First order R^2 | 0.7329±0.0987 | 0.8684±0.0225 | 0.7416±0.0204 | 0.823±0.081 |
| Higushi R^2 | 0.8875±0.0921 | 1.7178±0.4678 | 0.8817±0.0232 | 0.8363±0.0018 |
| Zero order release rate (h^{-1}) | 0.5123±0.1647 | 0.3322±0.0947 | 0.3141±0.0021 | 0.2817±0.0409 |



รูปที่ 21 กราฟแสดงการปลดปล่อยยา (*in vitro* percent cumulative release profiles) ของ ATRA จากสูตร

ตำรับ ME 1 (◆), ME 2 (●), ME 3 (■), and ME 4 (▲)

All data represent the mean±standard deviation (n = 3).

3.6 การศึกษาการดูดซึมยาแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* intestinal absorption study)

เนื่องจากค่าการละลายของ ATRA ใน fish oil มีค่าเท่ากับ 1.63 ± 0.01 mg/ml, จึงได้เตรียม ATRA ละลายใน fish oil ที่ความเข้มข้น 1.4 mg/ml (ร้อยละ 90 ของค่าการละลาย) เพื่อใช้เป็นสูตรควบคุมสำหรับการศึกษานี้ ค่า P_{app} ของ ATRA จากสูตรควบคุมและ ATRA-loaded microemulsion แสดงในตารางที่ 5 พบว่ามีเพียงแต่ P_{app} ของ ATRA-loaded ME 4 เท่านั้นที่มีค่ามากกว่าสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากสูตรควบคุมเป็นตำรับชนิดสารละลาย ในขณะที่สูตรตำรับไมโครอิมัลชันจัดเป็นระบบอนุภาคที่มีขนาดนาโนเมตร กลไกที่เป็นไปได้ในการเพิ่มการดูดซึมคือการที่มีอนุภาคเป็นระบบนำส่งโดยมีสารลดแรงตึงผิวเป็นสารเพิ่มการดูดซึม (absorption enhancer)

โดยทั่วไปแล้ว ระบบนำส่งยาชนิดคอลลอยด์ (colloidal drug carriers) สามารถเพิ่มการดูดซึมของยาละลายไขมันได้โดยการเพิ่มค่าการละลายโดยที่ตัวยาดูดซึมผ่านเยื่อบุลำไส้ในรูปตัวยาสระหรืออนุภาคที่บรรจุตัวยาวไว้ (drug entrapped in vesicles)

จากการศึกษาการปลดปล่อยยา (in vitro release study) ในขั้นตอนที่ 4.4 ATRA-loaded ME 4 มีอัตราการปลดปล่อยยาน้อยที่สุด การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการดูดซึมยาในรูปยาอิสระจึงไม่น่าจะเป็นกลไกหลักในการเพิ่มการดูดซึมผ่านลำไส้ กลไกหลักในการเพิ่มการดูดซึมของไมโครอิมัลชันน่าจะเกี่ยวข้องกับการมีอนุภาคเป็นระบบนำส่ง (vesicles as drug carriers) อย่างไรก็ตามสูตรตำรับที่สามารถเพิ่มการดูดซึมของ ATRA ได้มากกว่าสูตรควบคุมคือ ATRA-loaded ME 4 ซึ่งมีปริมาณของ surfactant mixture มากที่สุด (ร้อยละ 90 ของน้ำหนัก) จึงคาดว่าสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวในตำรับไมโครอิมัลชันมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการดูดซึมผ่านลำไส้มากกว่าชนิดของไมโครอิมัลชัน

ตามทฤษฎีแล้ว สูตรตำรับที่เป็นชนิดไขมันสามารถเพิ่มการดูดซึมยาได้โดยการเพิ่มการเพิ่มความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์และการเพิ่มการแพร่ผ่านเซลล์แบบ transcellular การเปิด tight junctions เพื่อให้ยาแพร่ผ่านได้ การยับยั้งการขับออกของ P-glycoprotein และการเพิ่มการนำส่งทางระบบน้ำเหลือง

(lymphatic drug transport) [9] การศึกษานี้คาดว่าระบบนำส่งแบบอนุภาคโดยเฉพาะไมโครอิมัลชันสามารถ
เพิ่มการดูดซึมจากหลายกลไกตามที่ได้บรรยาย

5. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ขึ้นมาได้ โดยมี fish oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน มี oleth-5 และ Transcutol P เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมตามลำดับ ซึ่งยังไม่มีเคยมีรายงานการใช้ oleth-5 ในการเตรียมไมโครอิมัลชันมาก่อน อนุภาคที่เตรียมได้มีรูปร่างกลมและมีขนาดในช่วงนาโนเมตร ระบบไมโครอิมัลชันมีจลนศาสตร์การปลดปล่อย ATRA เป็นอันดับศูนย์ จากการทดสอบการดูดซึมแบบ ภายนอกร่างกายพบว่าระบบไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้นี้สามารถเพิ่มการดูดซึมทางลำไส้ของยา ATRA ได้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Muindi, J.R., Frankel, S.R., Huselton, C. et al. Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res.* 1992 (52) 2138-42.
- [2] Qi, Z.H. and Shieh, W.J. Aqueous Media for Effective Delivery of Tretinoin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2002 (44) 133-136.
- [3] Available from <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00755> cited on 10 June 2016.
- [4] Mrestani, Y., Behbood, L., Härtl, A. et al. Microemulsion and mixed micelle for oral administration as new drug formulations for highly hydrophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2010 (74) 219-222.
- [5] Al Abood, R.M., Talegaonkar, S., Tariq, M. et al. Microemulsion as a tool for the transdermal delivery of ondansetron for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013 (101) 143-151.
- [6] Cai, W., Deng, W., Yang, H. et al. A propofol microemulsion with low free propofol in the aqueous phase: formulation, physicochemical characterization, stability and pharmacokinetics. *Int J Pharm.* 2012 (436) 536-544.
- [7] Kumar, R. and Sinha, V.R. Preparation and optimization of voriconazole microemulsion for ocular delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 (117) 82-88.
- [8] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Retinoic_acid#section=Stability cited on 27/9/2016.
- [9] O'Driscoll, C.M. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2002 (15) 405-415.

ภาคผนวก

Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid

Thirapit Subongkot¹
Tanasait Ngawhirunpat²

¹Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand; ²Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand

Abstract: This study was aimed to develop a novel microemulsion that contained oleth-5 as a surfactant to enhance the oral absorption of all-trans retinoic acid (ATRA). The prepared microemulsion was evaluated for its particle size, shape, zeta potential, in vitro release, in vitro intestinal absorption, intestinal membrane cytotoxicity and stability. The obtained microemulsion was spherical in shape with a particle size of <200 nm and a negative surface charge. The in vitro release of the ATRA-loaded microemulsion was best fit with the zero-order model. This microemulsion significantly improved the intestinal absorption of ATRA. Confocal laser scanning microscopy analysis using a fluorescent dye-loaded microemulsion also confirmed the intestinal absorption result. The intestinal membrane cytotoxicity of the ATRA-loaded microemulsion did not differ from an edible oil (fish oil). Stability testing showed that the ATRA-loaded microemulsion was more stable at 25°C than 40°C.

Keywords: microemulsion, all-trans retinoic acid, oral absorption enhancement, oleth-5, fish oil

Introduction

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a subtype of the white blood cell cancer, acute myeloid leukemia. APL is a life-threatening disease that is caused by an arrest of leukocyte differentiation at the promyelocyte stage. The bleeding abnormality, intravascular coagulopathy that occurs in APL rapidly leads to a fatal outcome in the patients.¹

All-trans retinoic acid (ATRA) or tretinoin (Figure 1) is a drug of choice for treatment of APL because it induces the differentiation of immature promyeloblasts into mature granulocytes.² However, the oral bioavailability of ATRA is poor and variable because of its extremely low water solubility. This limits its therapeutic efficacy in clinical applications.³

To achieve a therapeutic drug level following oral administration, a drug must be easily absorbed from gastrointestinal (GI) tract. According to Biopharmaceutics Classification System (BCS), drugs that are easily absorbed from the GI tract are water soluble and highly permeable. However, ATRA, which has molecular weight 300 g/mole, is a water-insoluble drug (0.19 µg/mL)⁴ and has a low permeability (log P=6.3). Therefore, ATRA is classified as BCS class 4 that exhibits very poor oral absorption.

The effective delivery of ATRA in an oral dosage form is very challenging. One report showed that the oral bioavailability of ATRA could be improved by using pegylated ATRA prodrug-based nanomicelles.⁵ However, the application of this technique for production on a large scale is limited because it requires a complicated synthesis process. Development of a simple method to improve the solubility and oral absorption of ATRA to permit industrial manufacturing is necessary.

Correspondence: Thirapit Subongkot
Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand
Tel/fax +66 038 102 610
Email titanicto@hotmail.com

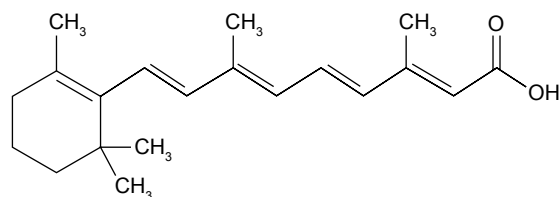


Figure 1 Structure of all-trans retinoic acid.

Microemulsions (ME) are transparent colloidal systems consisting of oil, surfactant, co-surfactant and water. The advantages of microemulsions are spontaneous formation, thermodynamic stability, the simplicity of manufacture and high-solubilization capacity for both lipophilic and hydrophilic compounds. Microemulsions have been used to improve the solubility and bioavailability of various drugs such as elacridar,⁶ paclitaxel,⁷ cyclosporine,⁸ acyclovir,⁹ tetramethylpyrazine,¹⁰ fexofenadine¹¹ and simvastatin.¹²

This study, therefore, selected microemulsion as a delivery system to improve ATRA solubility and oral absorption. Novel microemulsion formulations were prepared using oleth-5 as the surfactant, which had never been published before. To permit safe administration as an oral dosage form, fish oil, a dietary source of long-chain omega-3 fatty acids that can reduce plasma triglycerides, was used as the oil phase. The physicochemical properties of prepared microemulsion, including *in vitro* release, *in vitro* intestinal absorption, intestinal membrane cytotoxicity and stability, were evaluated. In addition, the penetration of a fluorescent compound-loaded microemulsion through the intestine was also characterized.

Materials and methods

Materials

ATRA was purchased from Jiangxi Hengxiang Pharmaceutical Technology Co., Ltd. (Jiangxi, China) and Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Fish oil was purchased from Sigma Aldrich. Oleth-5 (Eumulgin 05) was purchased from BASF Corporation (Ludwigshafen, Germany). Transcutol P was purchased from Carlo Erba Reagents (Milan, Italy). Nile red was purchased from TCI (Tokyo, Japan). All other reagents were of analytical grade and were commercially available.

Solubility study

The solubility of ATRA in fish oil and various surfactants was determined by adding an excess amount of ATRA into 2 mL of each vehicle in an amber glass bottle, followed by mixing with a magnetic stirrer at 25°C for 24 h. The suspension was centrifuged at 11,180×g for 10 min to remove the

excess ATRA. The supernatant was then, filtered through 0.22 µm membrane after which the concentration of ATRA in the supernatant was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC) after an appropriate dilution with isopropyl alcohol. The surfactant that provided the highest solubility of ATRA was chosen as the surfactant for microemulsion preparation with the goal of increasing the solubility of ATRA.

Preparation of microemulsion

Screening of co-surfactants

To determine the appropriate pseudo-ternary phase diagram having the largest microemulsion area, pseudo-ternary phase diagrams for the various co-surfactants were produced. Pseudo-ternary phase diagrams were constructed using the water titration method to obtain the concentration range of components for microemulsion.

To screen the co-surfactants, a microemulsion system that consisted of fish oil as oil phase, the surfactant that provided the highest solubility of ATRA as described in solubility study section, and oleth-5, Transcutol P, PEG-7 glyceryl cocoate (Cetiol HE), Tween 20 or 80 as co-surfactants were combined with distilled water as the water phase. The surfactant/co-surfactant weight ratio was 1:1. The criterion for the selection of pseudo-ternary phase diagram had the largest microemulsion region.

Construction of pseudo-ternary phase diagram of microemulsion

The surfactant and co-surfactant were weighed to produce various ratios (1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 w/w) in each glass bottle and were vortexed vigorously for 30 s to produce the surfactant mixture (Sm). Afterward, the oil phase and the Sm were mixed to produce ratios of oil to Sm in the mixtures that varied from 9:1 to 1:9 (w/w). Distilled water was added dropwise to each oil/Sm mixture with gentle stirring to allow equilibration. After the addition of each aliquot of the water phase, the mixture was visually examined for transparency. The transparent mixtures were defined as the microemulsion region.

Solubility of ATRA in microemulsion

An excess amount of ATRA was added to the microemulsion formulations. The samples were continuously stirred for 24 h at 25°C. The suspension was centrifuged at 11,180×g for 10 min to remove the excess ATRA. The supernatant was then collected and filtered through 0.22 µm membrane. The ATRA concentrations in the filtered supernatant were

determined using HPLC after an appropriate dilution with isopropyl alcohol.

Preparation of ATRA-loaded microemulsion

Based on the microemulsion region in the pseudo-ternary phase diagrams, a microemulsion system that demonstrated good physicochemical properties was selected. The desirable criteria for choosing the formulations were having a particle size within 20–200 nm with a polydispersity index (PDI) <0.4 without signs of phase separation. ATRA was loaded into the microemulsions at 90% of the respective solubility as determined from the experiments described in Solubility of ATRA in microemulsion section. The microemulsion was prepared by mixing the oil, the surfactant/co-surfactant mixture and water by weight ratio using a magnetic stirrer at ambient temperature. ATRA was accurately weighed and the appropriate weight was added to the microemulsion formulations followed by stirring with a magnetic stirrer at ambient temperature.

Characterization of microemulsion

Mean droplet size, surface charge, size distribution and electrical conductivity

The droplet size, surface charge (zeta potential), size distribution (PDI) and electrical conductivity of the microemulsion formulations with and without ATRA were measured using a dynamic light scattering (DLS) particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS; Malvern Instrument, Malvern, UK) with a 4 mW He–Ne laser at a scattering angle of 173°. All the measurements were carried out under ambient conditions and in triplicate.

Transmission electron microscopy (TEM)

TEM was used to analyze the particle shape and size of ATRA-loaded microemulsion. A droplet of the microemulsion was placed on a formvar-coated copper grid, and the excess sample volume was removed with a sheet of filter paper. After drying, the sample was visualized under the TEM (Philips Tecnai 20; FEI/Philips Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands). Microscopy was performed at 80 kV.

Rheological behavior

The rheological properties of ATRA-loaded microemulsion were evaluated by rheometer (Kinexus Pro; Malvern Instrument) using peltier cylinder cartridge (cup and bob). The analysis was carried out with a shear rate ranging from 1 to 97 s⁻¹. All the measurements were carried out at 25°C and in triplicate.

In vitro drug release

The in vitro release was performed in an airtight glass container with light protection. The microemulsion formulation (4 mL) was added to a dialysis bag (CelluSep T2®; Membrane Filtration Products Inc., Seguin, TX, USA) made from regenerated cellulose (molecular weight cut-off 6,000–8,000 Da). The dialysis system was suspended in a release volume of 80 mL 50% v/v ethanol in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) that was stirred with a magnetic bar at a rate of 200 rpm at 37°C. A sample of the receiver medium was removed at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 24 h and replaced immediately with the same volume of fresh medium (preheated at 37°C before replacement) to maintain a constant volume. The concentration of ATRA in the samples was assayed using HPLC. The cumulative amount of drug released was calculated as a function of time and the release rate was determined. The release kinetics were analyzed using linear regression equations and were fit to zero-order, first-order, and Higuchi diffusion models. The following linear regression equations were used:

$$Q = Q_0 - K_0 t \text{ for zero-order kinetics}$$

$$\log Q = \log Q_0 - K_1 t / 2.303 \text{ for first-order kinetics}$$

$$Q = K_h t^{1/2} \text{ for the Higuchi diffusion model}$$

where Q is the amount of drug released per unit area at time (t), t is time (h), Q₀ = initial amount of drug, K₀ = zero order release rate, K₁ = first order release rate and K_h = Higuchi release rate.

In vitro intestinal absorption study

The in vitro oral absorption study of the ATRA-loaded microemulsion and control (ATRA in fish oil) was performed using Franz diffusion cells based on reports that indicated that porcine intestine can be used to predict human intestinal permeability.^{13,14} Porcine intestines (ileum) provided by a local slaughterhouse were used as permeability barrier membrane for this study. The intestines were sectioned and washed with PBS to remove the lumen contents prior to the absorption study. The receiver compartment was filled with 6.5 mL of 50% v/v ethanol in PBS (pH 7.4) and stirred with a magnetic bar at a rate of 500 rpm. The diffusion cells were connected to a circulating water bath to maintain the temperature at 37°C. Samples of the receiver medium were removed at 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h and replaced with the same volume of fresh medium to maintain a constant volume. The concentration of ATRA in the samples was

assayed using HPLC. The cumulative amount of ATRA was plotted against time and the apparent permeability (P_{app}) was calculated according to the equation given below:

$$P_{app} = dQ/dt \times [1/(A \times C_0)]$$

where dQ/dt is the linear appearance rate of the ATRA in the receiver compartment, A is the exposed tissue area and C_0 is the donor concentration. All experiments were performed in triplicate.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) study

To confirm the *in vitro* oral absorption study, CLSM was used to evaluate the penetration into the porcine intestine using a fluorescent dye. Nile red, a lipophilic red fluorescent compound that has physicochemical properties ($\log P=5.0$ and molecular weight =318 g/mole)¹⁵ similar to those of ATRA was selected as the fluorescent dye. In this study, 2 formulations, fish oil as control and the microemulsion that provided the highest P_{app} based on the experiments described in *In vitro* intestinal absorption study section, were evaluated using equal concentration of nile red (0.1 mg/mL).

In vitro intestinal absorption study

The penetration test was performed using Franz diffusion cells as described in *In vitro* intestinal absorption study section except that the receiver medium was omitted. The donor compartment was filled with 2 mL of nile red in fish oil or the nile red-loaded microemulsion and treated for 3 h. The treated ileum was washed twice with PBS before examination using CLSM.

CLSM evaluation

A piece of the treated ileum described in *In vitro* intestinal absorption study section was placed on a 22×50 mm coverslip (MENZEL-GLÄSER®, Braunschweig, Germany). Visualization was accomplished using the 10× objective lens system of a Zeiss LSM 510 META inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a He-Ne 1 laser (excitation wavelength =543 nm, emission wavelength =580 nm). The tissue was scanned to obtain a series of x-z plane serial images of the Nile red using the laser to scan through the tissue to compare the penetration depths and fluorescence intensity. The fluorescence intensity was determined at the central horizontal line of each image using Zeiss LSM 5 operating software. The mean fluorescence intensity of each image was plotted as a function of the penetration depth.

Evaluation of intestinal membrane cytotoxicity

Lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay

To evaluate the safety of the novel ATRA-loaded microemulsion for oral administration, the intestinal membrane damage was investigated using the LDH activity test. The tested formulations of this study were the ATRA-loaded microemulsion that provided the highest P_{app} as described in *In vitro* intestinal absorption study section, ATRA in fish oil, the blank microemulsion and blank fish oil. PBS was used as negative control while 3% w/w Triton X-100 was used as a positive control as reported by Alama et al.¹⁶ This study was performed using Franz diffusion cells as described in *In vitro* intestinal absorption study section with the ileum sample as the membrane and in the absence of receiver medium. A total of 2 mL of each formulation was added to the donor compartment for 2 h. After that, each formulation in the donor compartment was removed, and the membrane was washed with 2 mL of PBS. The obtained PBS was then centrifuged at 1,000× g for 10 min at a temperature of 4°C. The supernatant was assayed for LDH activity using an LDH cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The absorbance was measured in triplicate at 492 nm using a microplate reader (AccuReader M965, Taipei, Taiwan). The percent cytotoxicity was calculated from the absorbance according to the equation below:

Cytotoxicity (%)

$$= \left[\frac{(\text{Tested formulation} - \text{Negative control})}{(\text{Positive control} - \text{Negative control})} \right] \times 100$$

Histological examination

To evaluate the morphological change of the intestinal tissue after treatment with each formulation, the tissues that had been treated with the ATRA-loaded microemulsion, ATRA-loaded fish oil, negative control (PBS) and positive control (3% w/w Triton X-100) as described in LDH cytotoxicity assay section were cut and fixed with 10% formaldehyde in PBS for 2 days before being dehydrated with ethanol, cleared with chloroform, infiltrated with melted paraffin, and embedded in paraffin. Each tissue was then sectioned at 5 µm and stained with Harris' hematoxylin and eosin (H&E) for morphological evaluation. The tissue morphology was interpreted by pathologist.

Formulation-stability study

The ATRA-loaded microemulsion that provided the highest P_{app} in the experiments described in *In vitro* intestinal

absorption study section was stored in light-protected and sealed containers at 25°C and 40°C for 6 months. Both the chemical and physical stability of ATRA were evaluated. The chemical stability was evaluated by determining the remaining ATRA content in the formulations using HPLC. The percentage of the ATRA remaining was compared with the amount on day 0. The evaluations of physical stability included visualization of clarity and phase separation, including particle size and surface charge. The particle size and surface charge were determined by DLS as described in mean droplet size, surface charge, size distribution and electrical conductivity section.

HPLC analysis

The ATRA was assayed by HPLC (Agilent 1260 infinity II LC systems, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) as previously reported by Charoenputtakhun et al¹⁷ using a C18 reversed-phase column (VertiSep UPS C18, Vertical Chromatography; Nonthaburi, Thailand) with dimensions of 5 µm, 4.6×250 mm. The mobile phase composed of an 84.5%:15.0%:0.5% v:v:v mixture of acetonitrile:water:glacial acetic acid. The flow rate was 1.5 mL/min, the injection volume was 20 µL, and the UV detection wavelength was 353 nm. The quantitative analysis of ATRA was obtained from the calibration curve, which had good linearity ($r^2 \geq 0.999$) in the range of 0.05–200 µg/mL. The accuracy of this method was 99.83±0.39. For precision, the percent relative standard deviation was 1.62. The limit of detection and limit of quantitation were 0.039 and 0.118 µg/mL, respectively.

Statistical analysis

All data were statistically analyzed using analysis of variance followed by post hoc testing. Differences of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

Solubility study

The solubility of ATRA in fish oil was 1.63±0.01 mg/mL. ATRA exhibited the highest solubility in oleth-5 (18.88±0.18 mg/mL) as shown in Table 1. Oleth-5 was therefore selected as the surfactant for microemulsion preparation. The surfactants other than oleth-5 in which the ATRA solubility was >11 mg/mL were selected as candidates for co-surfactant screening.

Preparation of the microemulsion

Screening of co-surfactants

To screen the co-surfactants, microemulsion systems composed of fish oil as oil phase, oleth-5 as surfactant and water

Table 1 Solubility of ATRA in various surfactants/co-surfactants

| Surfactants/co-surfactants | Solubility (mg/mL) |
|---|--------------------|
| Oleth-5 (Eumulgin 05) | 18.88±0.18 |
| Transcutol P | 18.53±0.08 |
| PEG-7 glyceryl cocoate (Cetiol HE) | 11.46±0.03 |
| Tween 20 | 11.71±0.01 |
| Tween 80 | 12.67±0.09 |
| Ethanol | 7.44±0.02 |
| Apricot kernel oil PEG-6 esters (Labrafil M 1944CS) | 6.11±0.03 |
| Propylene glycol | 0.811±0.002 |

Note: Each value represents the mean ± standard deviation (n=3).

Abbreviation: ATRA, all-trans retinoic acid.

as aqueous phase with the addition of various co-surfactants were studied. The selected co-surfactants for this study were Transcutol P, Cetiol HE, Tween 20 and 80. As shown in Figure 2, oleth-5 and Transcutol P as surfactant and co-surfactant, respectively, provided the largest microemulsion region. Hence, the microemulsion system composed of oleth-5 and Transcutol P as surfactant and co-surfactant, respectively, was chosen for further study.

Construction of pseudo-ternary phase diagram of microemulsion

To obtain the concentration range of the microemulsion components, pseudo-ternary phase diagrams were constructed. The optimal microemulsion formulation could be acquired from the observed microemulsion region. The microemulsion systems composed of fish oil as oil phase, water as the aqueous phase and various ratios of oleth-5 as surfactant and Transcutol P as co-surfactant were studied. The surfactant/co-surfactant mixtures were prepared with the following weight ratios: 1:1, 2:1, 3:1 and 4:1. The pseudo-ternary phase diagrams of microemulsions are shown in Figure 3. In each diagram, the gray area indicates the microemulsion region while the remaining area represents the coarse emulsion region. An increase in the surfactant/co-surfactant mixture ratio resulted in a decrease in the microemulsion region. Dilution by GI fluid may affect the physicochemical properties of a microemulsion formulation and disturb the drug absorption process in the GI tract. To maintain the physicochemical properties of microemulsion throughout the absorption period, a large area of microemulsion region is necessary for formulation selection. Thus, the microemulsion with surfactant/co-surfactant mixture ratio at 1:1 was selected for further study. Four microemulsion formulations that had good stability (absence of phase separation) and a particle size of not more than 200 nm were prepared as shown in Table 2.

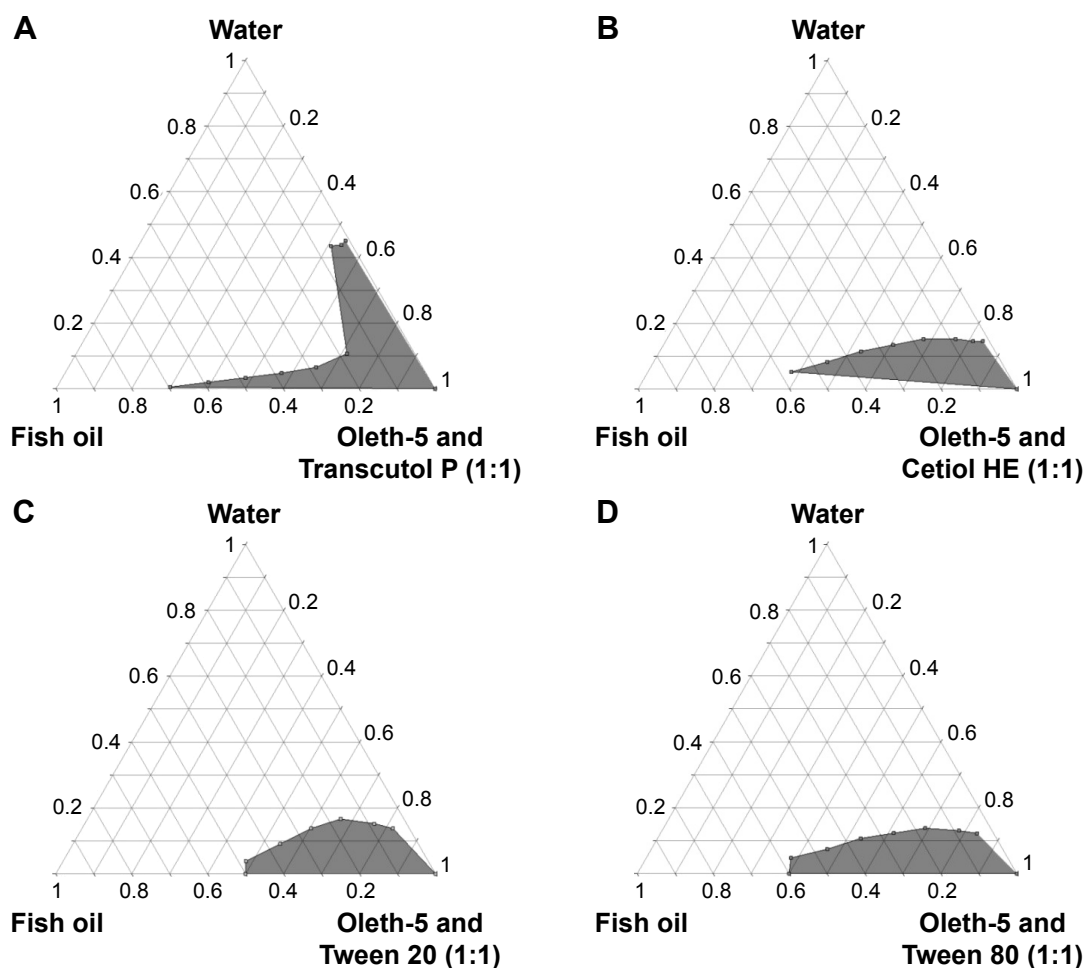


Figure 2 Pseudo-ternary phase diagram composed of fish oil as the oil phase with various surfactant mixtures (A) oleth-5 and Transcutol P (1:1), (B) oleth-5 and Cetiol HE (1:1), (C) oleth-5 and Tween 20 (1:1) and (D) oleth-5 and Tween 80 (1:1) as surfactant and co-surfactant, respectively. The gray area represents the microemulsion region.

Solubility of ATRA in the microemulsion

The ATRA solubility was in the range of 11.06–20.71 mg/mL as shown in Table 2. The increase in surfactant/co-surfactant mixture and oil phase resulted in enhanced ATRA solubility. Microemulsions can be used to fill soft gelatin capsules for orally convenient administration, but a high concentration of the drug is necessary to minimize the capsule size for ease in swallowing. ATRA was, therefore, loaded into the microemulsion formulations at 90% of their solubility as shown in Table 2.

Characterization of microemulsion

Mean droplet size, surface charge, size distribution and electrical conductivity

Both the microemulsion with ATRA (ATRA-loaded microemulsion) and without ATRA (blank microemulsion) were examined for their particle size, zeta potential, PDI and conductivity as shown in Table 3. The particle size of the blank microemulsion was between 38 and 102 nm whereas the ATRA-loaded microemulsion was between

42 and 178 nm. The average particle size of the ATRA-loaded microemulsion was significantly higher than that of the blank microemulsion, which indicated that the addition of ATRA increased the particle size of the microemulsion. The zeta potential of blank microemulsion was neutral whereas the ATRA-loaded microemulsion had a negative charge because ATRA is an acidic drug ($pK_a \sim 4$). Under neutral conditions ($pH \sim 7$), the ATRA-loaded microemulsion, therefore, had a negative charge. The PDI of the blank microemulsion was between 0.292 and 0.387 whereas that of the ATRA-loaded microemulsion was between 0.28 and 0.53. Only for ME 4 did the ATRA-loaded microemulsion have a significantly greater PDI than the blank microemulsion. Since it is highly lipophilic, the addition of a very large amount ATRA (18 mg/mL) resulted in a change in the oil phase ratio of microemulsion region. Therefore, the particle size distribution became broader.

Theoretically, there have been 3 microemulsion types, which are oil-in-water microemulsion, bicontinuous

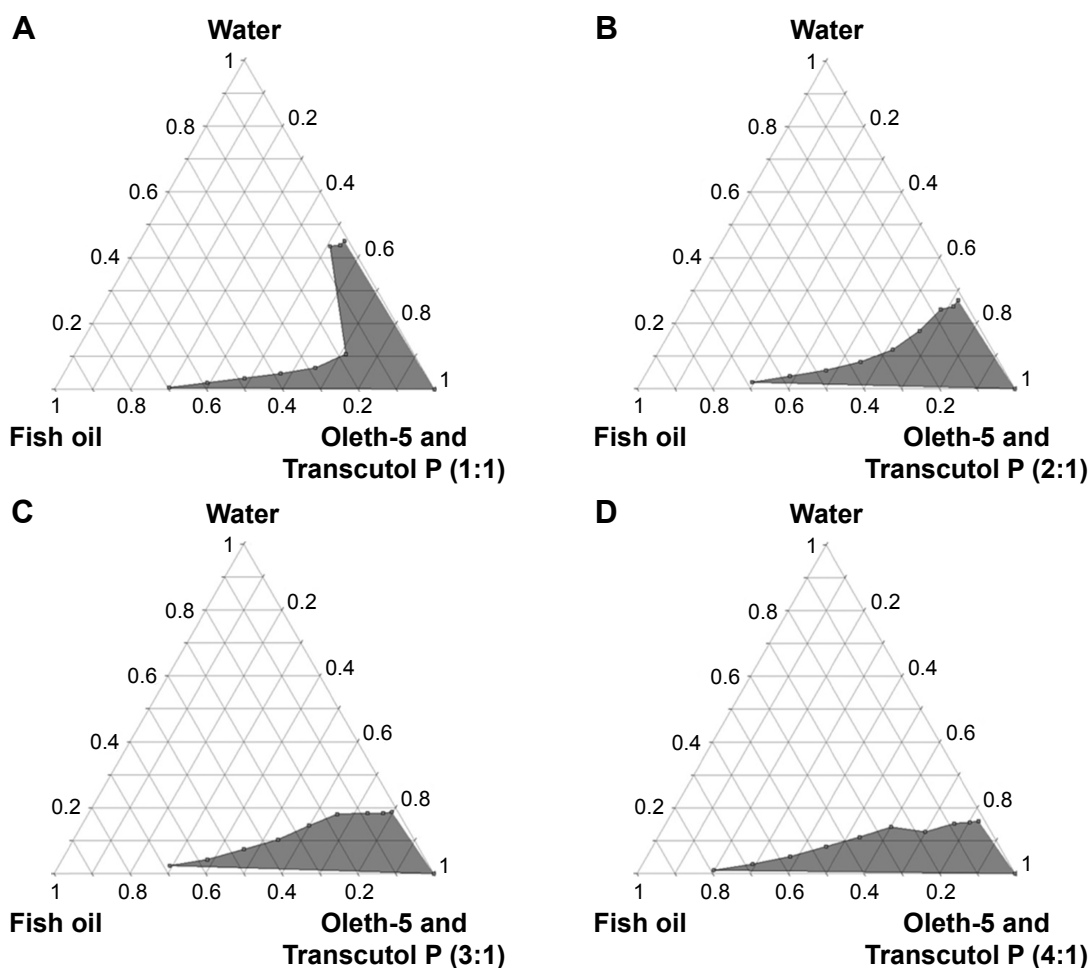


Figure 3 Pseudo-ternary phase diagram composed of fish oil as the oil phase with various surfactant and co-surfactant mixture (oleth-5 and Transcutol P) ratios (A) 1:1, (B) 2:1, (C) 3:1 and (D) 4:1. The gray area represents the microemulsion region.

microemulsion and water-in-oil microemulsion.^{18,19} The oil-in-water microemulsion is occurred when the ratio of oil is lower than water. Conversely, the water-in-oil microemulsion is presented when the ratio of water is lower than oil. In system in which the ratio of oil and water are similar, the bicontinuous microemulsion is formed.²⁰ The spherical nanoparticles can be seen from oil-in-water and water-in-oil microemulsion whereas non-spherical nanoparticles are the proposed structure of bicontinuous microemulsion.²⁰ The electrical conductivity is the useful parameter, which can

be used to evaluate the type of microemulsion. According to the microemulsion type evaluation using electrical conductivity measurements by Djordjevic et al,²¹ microemulsion formulation in which the ratio of oil phase was higher than water phase having conductivity between 2.9 and 3.8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was water-in-oil microemulsion. For microemulsions in which the ratio of water phase was higher than oil phase having conductivity ranging from 10.3 to 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ were bicontinuous microemulsion, whereas microemulsions having conductivity ranging from 80.5 to 94.3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ were

Table 2 Formulations, component ratio, ATRA solubility and ATRA loaded in microemulsions

| Formulations | Ratio | | | Solubility of ATRA (mg/mL) | ATRA loaded in microemulsion (mg/mL) |
|--------------|-------|---------------------------------|-------|----------------------------|--------------------------------------|
| | Oil | Surfactant mixture ^a | Water | | |
| ME 1 | 10 | 75 | 15 | 11.06 \pm 0.02* | 10 |
| ME 2 | 5 | 80 | 15 | 12.45 \pm 1.49* | 11 |
| ME 3 | 15 | 75 | 10 | 15.39 \pm 0.49* | 14 |
| ME 4 | 5 | 90 | 5 | 20.71 \pm 1.84* | 18 |

Notes: ^aSurfactant:co-surfactant ratio =1:1 w/w. *Each value represents the mean \pm standard deviation (n=3).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

Table 3 Particle size, zeta potential, PDI and electrical conductivity of MEs without ATRA (blank ME) and ATRA-loaded ME

| Formulations | Particle size (nm) | | Zeta potential (mV) | | PDI | | Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | |
|--------------|--------------------|------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-------------------|--|----------------|
| | Blank ME | ATRA loaded ME | Blank ME | ATRA loaded ME | Blank ME | ATRA loaded ME | Blank ME | ATRA loaded ME |
| ME 1 | 102.05 \pm 38.36 | 177.9 \pm 23.5 | 0.14 \pm 0.13 | -0.04 \pm 0.21 | 0.292 \pm 0.057 | 0.28 \pm 0.03 | 75 \pm 2 | 61 \pm 1 |
| ME 2 | 38.1 \pm 2.4 | 42.18 \pm 2.65 | 0.10 \pm 0.06 | -0.08 \pm 0.03 | 0.35 \pm 0.02 | 0.345 \pm 0.05 | 87 \pm 2 | 70 \pm 1 |
| ME 3 | 92.29 \pm 15.69 | 104.9 \pm 34.9 | 0.087 \pm 0.231 | -0.0075 \pm 0.3704 | 0.387 \pm 0.074 | 0.318 \pm 0.107 | 51 \pm 3 | 47 \pm 5 |
| ME 4 | 39.81 \pm 32.16 | 167.7 \pm 30.1 | 0.10 \pm 0.05 | -0.26 \pm 0.15 | 0.313 \pm 0.123 | 0.531 \pm 0.034 | 35 \pm 1 | 38 \pm 4 |

Note: Each value represents the mean \pm standard deviation (n=3).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion; PDI, polydispersity index.

oil-in-water microemulsion. Gundogdu et al¹¹ reported that the conductivity of water-in-oil microemulsion (the ratio of oil phase was higher than water phase) was 1.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Xing et al²² prepared 3 microemulsion formulations in which all formulations had the ratio of water phase more than oil phase. They found that their microemulsion had electrical conductivity between 65 and 71 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and concluded that all microemulsion formulations were oil-in-water microemulsion. Since there have been no reports about the cut-off value of electrical conductivity for microemulsion-type evaluation. The criteria were, therefore, set based on the previously described literatures in order to identify microemulsion type using both the ratio of oil and water phase and electrical conductivity. The microemulsion-type identification was considered mainly from the ratio of oil and water phase followed by electrical conductivity. If the ratio of oil phase is more than water phase, it will be water-in-oil microemulsion. If the ratio of water phase is more than oil phase and the conductivity is higher than 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, it will be oil-in-water microemulsion. It will be bicontinuous microemulsion, when the ratio of water phase is equal to oil phase or the ratio of water phase is more than oil phase with the conductivity not more than 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

The conductivity of blank microemulsion ranged from 35 to 87 $\mu\text{S}/\text{cm}$ whereas that of the ATRA-loaded microemulsion ranged from 38 to 70 $\mu\text{S}/\text{cm}$. According to the above criteria, this suggested that blank ME 1, ATRA-loaded ME 1, blank ME 2 and ATRA-loaded ME 2 were oil-in-water microemulsion. Blank ME 3 and ATRA-loaded ME 3 were water-in-oil microemulsion. Blank ME 4 was bicontinuous microemulsion. Although ATRA-loaded ME 4 had the ratio of water phase equal to oil phase, very large amount of highly lipophilic drug was added and the spherical particles were still observed as evaluated by TEM (Figure 4D). Therefore, ATRA-loaded ME 4 was water-in-oil microemulsion.

ATRA-loaded ME 1 and ATRA-loaded ME 2 had average conductivities significantly lower than blank ME 1 and

blank ME 2, respectively. The addition of ATRA, which is highly lipophilic drug, in microemulsion led to the decrease of the conductivity by increasing the ratio of oil phase, especially in oil-in-water microemulsion. These results agreed with the result of Djekic et al²³ that the addition of lipophilic drug (ibuprofen) resulted in the decrease of the conductivity of oil-in-water microemulsion when compared with blank microemulsion. However, the average conductivities of ATRA-loaded ME 3 and ATRA-loaded ME 4 were not significantly different compared with blank ME 3 and blank ME4, respectively. Since ME 3 and ME 4 were water-in-oil microemulsion and bicontinuous microemulsion, respectively, containing very low amount of water, the addition of ATRA, therefore, did not affect their conductivities.

Transmission electron microscopy

The TEM images of all of the microemulsion formulations (ME 1-ME 4) demonstrated nanospheres as shown in Figure 4. The average sizes of ME 1, ME 2, ME 3 and ME 4 were 186.55 \pm 10.68, 44.73 \pm 4.29, 112.31 \pm 6.46, 165.98 \pm 14.56 nm, respectively. The average particle sizes obtained from DLS were not significantly different from those obtained using the TEM technique.

Rheological behavior

The rheological behaviors of ATRA-loaded ME 1, ATRA-loaded ME 2, ATRA-loaded ME 3 and ATRA-loaded ME 4 are shown in Figure 5. The rheological profiles revealed that all ATRA-loaded microemulsion exhibited a linear relationship between shear rate and shear stress, indicating that ATRA-loaded microemulsion demonstrated a Newtonian flow behavior.²⁴

In vitro drug release

The in vitro release profiles of ATRA from the various microemulsion formulations are shown in Figure 6. The release kinetics of ATRA from each microemulsion formulation

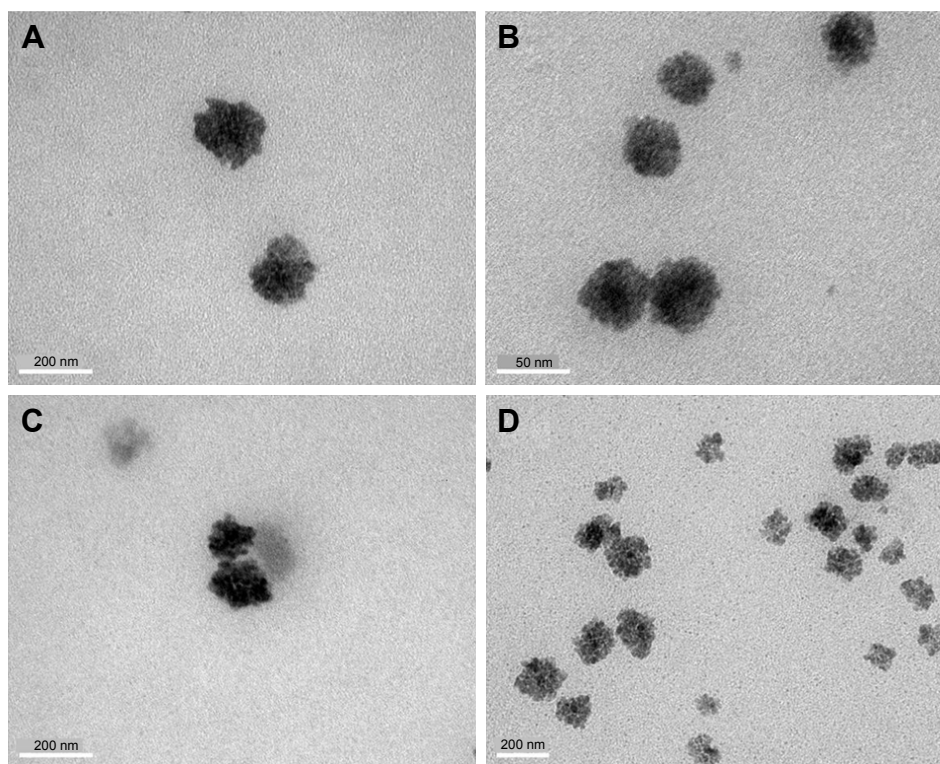


Figure 4 Transmission electron microscopy images of (A) ATRA-loaded ME 1, (B) ATRA-loaded ME 2, (C) ATRA-loaded ME 3 and (D) ATRA-loaded ME 4. Magnification $\times 200$.

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

were evaluated by fitting with the zero-order, first-order and Higuchi models. Based on the coefficient of determination (R^2), the zero-order model was found to provide the best fit for the ATRA release profiles of all microemulsion formulations as shown in Table 4. The release rate for ME 1

was significantly greater than those for ME 3 and ME 4. The release rate of ME 1 was not significantly different from that of ME 2. There were no significant differences in the release rates between ME 3 and ME 4. Regarding the type of microemulsion as evaluated by electrical conductivity,

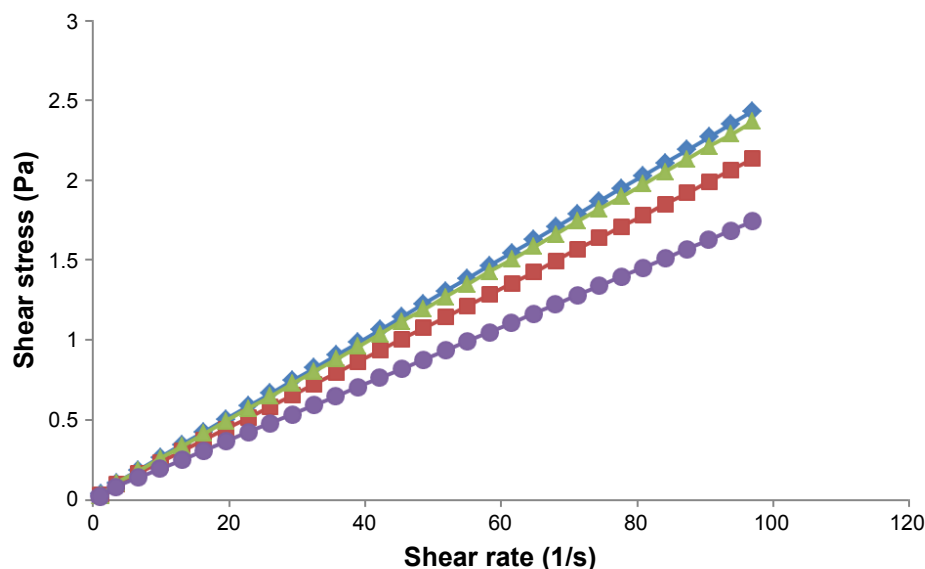


Figure 5 The rheological behaviors of ATRA-loaded ME 1 (◆), ATRA-loaded ME 2 (▲), ATRA-loaded ME 3 (■) and ATRA-loaded ME 4 (●). All data represent the mean \pm standard deviation ($n=3$).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

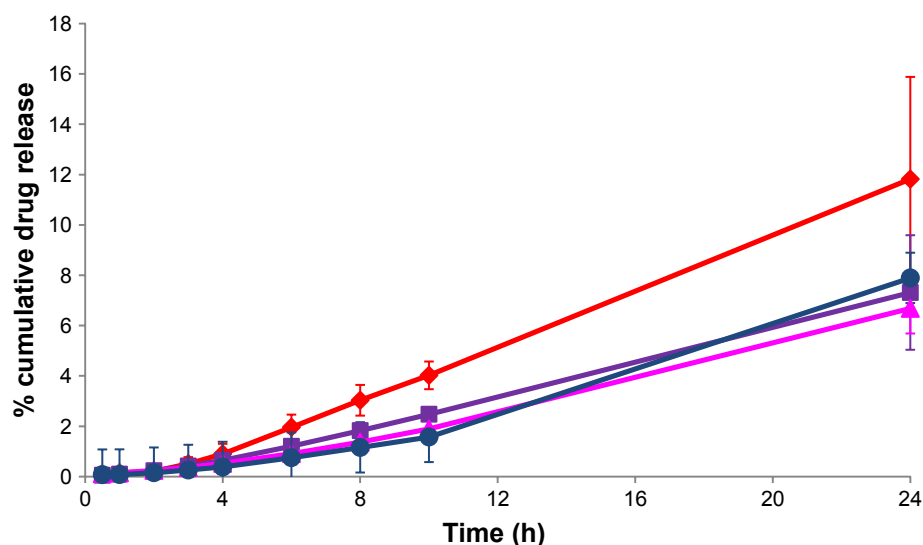


Figure 6 The in vitro percent cumulative release profiles of all-trans retinoic acid from the microemulsion formulations ME 1 (♦), ME 2 (●), ME 3 (■) and ME 4 (▲). All data represent the mean \pm standard deviation ($n=3$).

Abbreviation: ME, microemulsion.

ATRA-loaded ME 1 and ATRA-loaded ME 2 were oil-in-water microemulsion while ATRA-loaded ME 3 and ATRA-loaded ME 4 were water-in-oil microemulsion. The ATRA release rate correlated with the type of microemulsion that the release rate of oil-in-water microemulsion was higher than water-in-oil microemulsion.

Djordjevic et al²⁵ investigated the effect of oil-in-water microemulsion and water-in-oil microemulsion on release rate of diclofenac diethylamine, a drug that can be solubilized in oil more than in water. Our results agreed with their findings, which revealed that oil-in-water microemulsion had drug release rate more than water-in-oil microemulsion.

In vitro intestinal absorption study

Since the solubility of ATRA in fish oil was 1.63 ± 0.01 mg/mL, fish oil was combined with ATRA at 1.4 mg/mL (90% of its solubility) for use as the control for this study. The P_{app} values for ATRA in the control and various ATRA-loaded microemulsion formulations are shown in Table 5. Only the P_{app} for ATRA-loaded ME 4 was significantly higher than that of the control. Since the control formulation was a simple

lipid solution whereas the microemulsion formulations were nanoscale-sized vesicles, the possible absorption enhancement mechanism might involve the vesicles as drug carriers and surfactants as absorption enhancer.

Generally, colloidal drug carriers increase lipophilic drug absorption by solubility enhancement, in which drug can be absorbed through the intestinal membrane as the free drug or drug entrapped in vesicles. According to the in vitro release study described in In vitro drug release section, ATRA-loaded ME 4 had a low release rate. This result indicated that free drug absorption might not be a major mechanism for the enhanced intestinal absorption. The major absorption enhancement mechanism for the microemulsions might involve the vesicles as drug carriers. However, the formulation, which could increase the absorption of ATRA was only ATRA-loaded ME 4 that contained the highest amount of surfactant mixture (90% of total weight). This suggested that the proportion of surfactant in microemulsion formulation played an important role in the intestinal drug absorption enhancement more than the type of microemulsion.

Table 4 In vitro release characteristics of ATRA-loaded MEs

| Release kinetics | ME 1 | ME 2 | ME 3 | ME 4 |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Zero order R^2 | 0.9745 \pm 0.0268 | 0.9428 \pm 0.0239 | 0.9893 \pm 0.0075 | 0.9720 \pm 0.0006 |
| First order R^2 | 0.7329 \pm 0.0987 | 0.8684 \pm 0.0225 | 0.7416 \pm 0.0204 | 0.823 \pm 0.081 |
| Higushi R^2 | 0.8875 \pm 0.0921 | 1.7178 \pm 0.4678 | 0.8817 \pm 0.0232 | 0.8363 \pm 0.0018 |
| Zero order release rate (h^{-1}) | 0.5123 \pm 0.1647 | 0.3322 \pm 0.0947 | 0.3141 \pm 0.0021 | 0.2817 \pm 0.0409 |

Note: Each value represents the mean \pm standard deviation ($n=3$).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

Table 5 The apparent permeability (P_{app}) of ATRA from each formulation

| Formulations (ATRA concentration, mg/mL) | P_{app} ($\times 10^{-7}$ cm/s) |
|--|------------------------------------|
| Fish oil (1.4) | 18.11 \pm 1.58 |
| ATRA-loaded ME 1 (10) | 16.31 \pm 1.41 |
| ATRA-loaded ME 2 (11) | 13.73 \pm 0.89 |
| ATRA-loaded ME 3 (14) | 17.29 \pm 4.13 |
| ATRA-loaded ME 4 (18) | 24.42 \pm 1.77 |

Note: Each value represents the mean \pm standard deviation (n=3).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

Theoretically, lipid-based formulations can improve drug absorption by increasing membrane fluidity and facilitating transcellular absorption, opening tight junctions to allow drug transport, inhibiting P-glycoprotein-mediated drug efflux, and enhancing lymphatic drug transport.²⁶ These studies suggested that the vesicle drug carriers, especially microemulsion enhanced drug absorption from various mechanisms as described above.

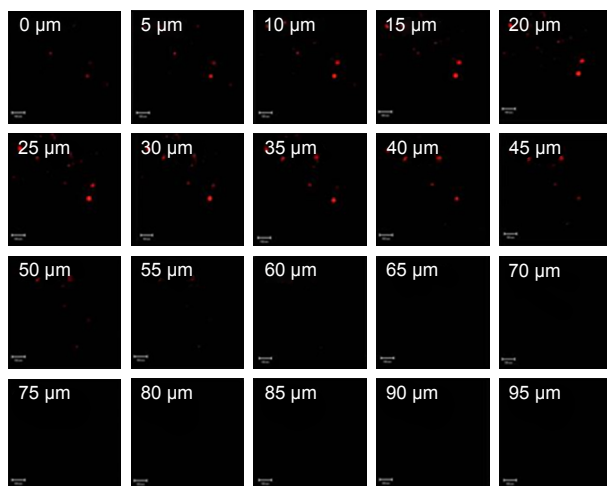
CLSM study

According to the in vitro intestinal absorption study described in In vitro intestinal absorption study section, ME 4 provided the highest P_{app} values. Therefore, ME 4 was selected for loading with Nile red to compare the penetration depths and fluorescent intensity with the control (Nile red in fish oil).

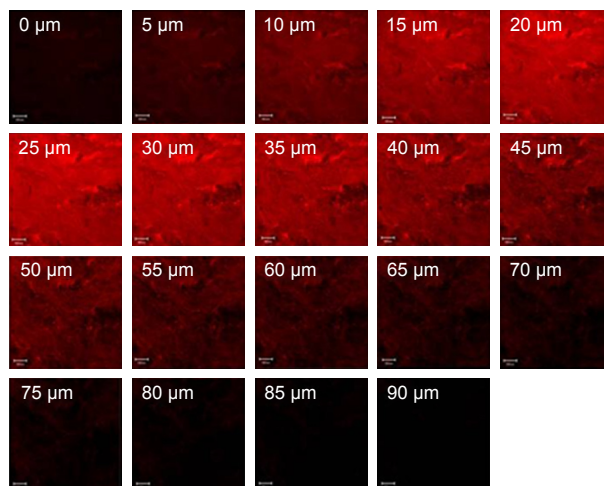
Figure 7A1 and B1 show the serial x-z plane images at different penetration depths for Nile red in fish oil and Nile red-loaded ME 4. Nile red in fish oil could penetrate to 50 μ m while the Nile red-loaded ME 4 could penetrate to 80 μ m. The fluorescent intensity profiles of Nile red at various penetration depths for the fish oil control and ME 4 are shown in Figure 8. ME 4 also demonstrated a higher fluorescent intensity of the Nile red than fish oil.

These findings agreed with the in vitro intestinal absorption study that ME 4 could increase absorption of lipophilic molecules when compared with control.

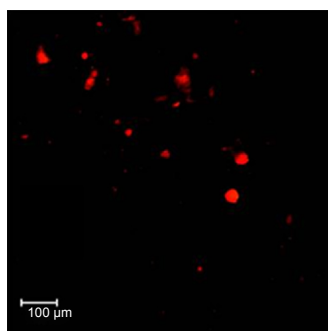
A1



B1



A2



B2

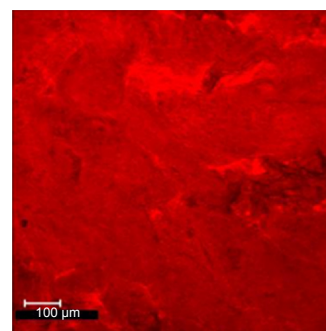


Figure 7 Confocal laser scanning microscopy images show x-z plane serial penetration of a porcine intestine treated with (A1) Nile red in fish oil and (B1) Nile red-loaded ME 4 at a time of 3 h, scale bar represents 100 μ m. The (A2) and (B2) images are the intensity projections through the z-axis of (A1) and (B1), respectively. The scale bar represents 100 μ m.

Abbreviation: ME, microemulsion.

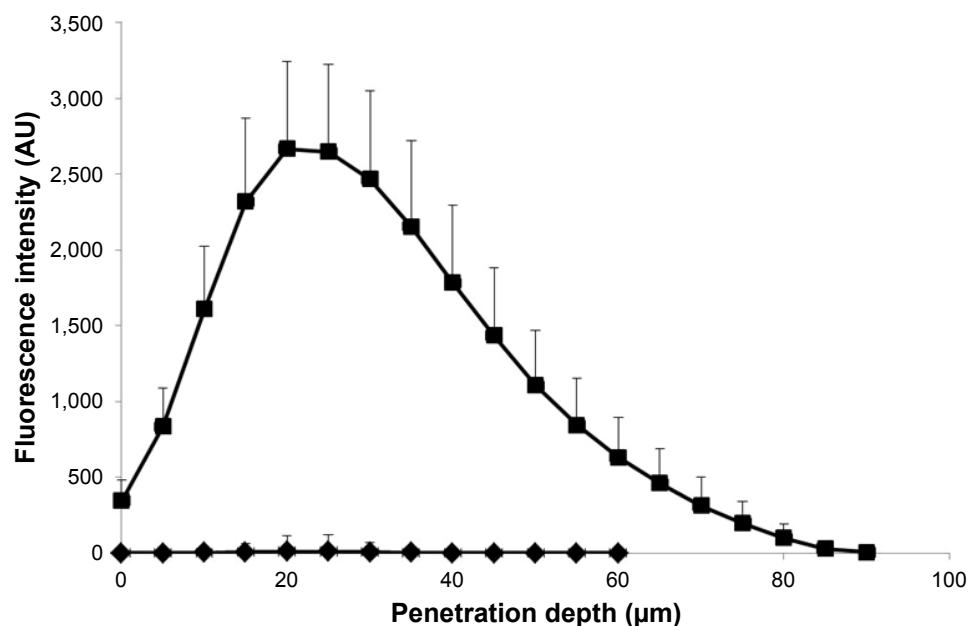


Figure 8 Comparison of fluorescence intensity profiles of Nile red at various depths into the intestine shown in Figure 7. All data represent the mean \pm standard deviation. **Abbreviation:** AU, arbitrary unit.

Evaluation of intestinal membrane damage

LDH cytotoxicity assay

To evaluate the safety of the microemulsion for oral administration, the LDH cytotoxicity assay was applied for comparison with the edible oil (fish oil) as a control. The percent cytotoxicity of the blank fish oil, blank ME 4, ATRA in fish oil and ATRA-loaded ME 4 are shown in Table 6. The percent cytotoxicity of the blank fish oil was not significantly different from ATRA in fish oil, and the percent cytotoxicity of the blank ME 4 was also not significantly different from the ATRA-loaded ME 4, which indicated that the addition of ATRA did not affect the cytotoxicity. The percent cytotoxicity of the blank fish oil was not significantly different from the blank ME 4, which indicated that the amount of the surfactant mixture in microemulsion did not affect the cytotoxicity. The percent cytotoxicity of the blank ME 4 was

less than that of ATRA in fish oil. There were no significant differences among the blank fish oil, ATRA in fish oil and ATRA-loaded ME 4. The percent cytotoxicity was not significantly different between the ATRA-loaded ME 4 and blank fish oil. These findings suggested that the ATRA-loaded ME 4 was safe for oral administration because the percent cytotoxicity of the ATRA-loaded ME 4 did not differ from that of fish oil, an edible oil, which is generally used as food supplement.

Histological examination

After being treated with each formulation for the LDH cytotoxicity assay, the intestinal tissues were stained with H&E stain to evaluate their morphological changes. The tissues that were treated with PBS, 3% w/w Triton X-100, ATRA in fish oil and ATRA-loaded ME 4 are shown in Figure 9A–D, respectively. Figure 9A shows that in the tissues that were treated with PBS, the villi were highly intact and the intestinal glands were viable. The tissue treated with 3% w/w Triton X-100 showed severe degeneration of the villi, as seen in Figure 9B; however, the intestinal glands were still viable. Figure 9C shows tissue that was treated with ATRA in fish oil in which the villi were intact and villus cells were viable compared with the tissue that was treated with 3% w/w Triton X-100 (Figure 9B). Figure 9D shows tissue that was treated with ATRA-loaded ME 4 in which villi were still intact, and the villus cells, as well as the intestinal glands,

Table 6 The percent cytotoxicity of blank fish oil, blank ME 4, ATRA in fish oil and ATRA-loaded ME 4

| Formulations | % cytotoxicity |
|------------------|------------------|
| Blank fish oil | 15.18 \pm 0.12 |
| Blank ME 4 | 5.61 \pm 6.23 |
| ATRA in fish oil | 17.18 \pm 7.68 |
| ATRA-loaded ME 4 | 13.91 \pm 2.13 |

Note: Each value represents the mean \pm standard deviation (n=3).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

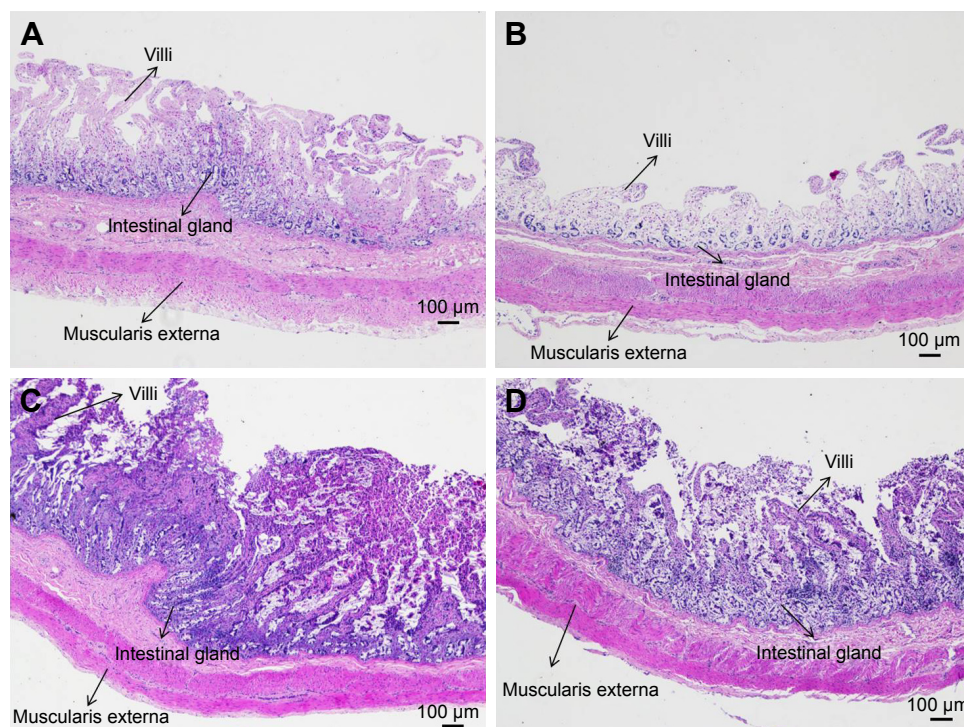


Figure 9 H&E-stained porcine intestine treated with (A) phosphate-buffered saline, (B) 3% w/w Triton X-100, (C) ATRA in fish oil and (D) ATRA-loaded ME 4. **Abbreviations:** ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

were viable compared with the tissue that was treated with 3% w/w Triton X-100 (Figure 9B). The villi of the tissue that had been treated with the ATRA-loaded ME 4 (Figure 9D) did not differ from the villi of the tissue that had been treated with ATRA in fish oil (Figure 9C). These morphological changes agreed with the LDH cytotoxicity evaluation that the cytotoxicity of the ATRA-loaded ME 4 did not differ from that of ATRA in fish oil.

Formulation-stability study

Although microemulsion is generally regarded as thermodynamically stable, the increase in the amount of lipophilic drug loaded in microemulsion resulting in the instability of microemulsion such as translucent and phase separation.²⁷ The ATRA-loaded ME 4 was stored at 25°C and 40°C to evaluate its chemical and physical stability. During storage at 25°C or 40°C for 6 months, the microemulsion was still transparent and there was no phase separation or drug precipitation. The percentages of ATRA remaining at 25°C and 40°C after 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months compared with baseline are shown in Figure 10. At 6 months, the average percentage of ATRA remaining at 25°C was 64.68 ± 1.84 whereas the value at 40°C was 57.67 ± 0.93 . The average percentage of ATRA remaining at 25°C was significantly higher than at

40°C, indicating that the ATRA-loaded ME 4 was more stable at 25°C than 40°C.

Tables 7 and 8 show the average particle sizes and zeta potentials for the ATRA-loaded ME 4 at baseline, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months after preparation when stored at 25 or 40°C. The average particle sizes of the ATRA-loaded ME 4 at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months after preparation at either 25°C or 40°C did not significantly differ from that baseline. These results indicated that the storage temperature did not affect the particle size of the ATRA-loaded ME 4.

The average zeta potentials for the ATRA-loaded ME 4 at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months after preparation at either 25°C or 40°C also did not significantly differ from the value observed at baseline. These results indicated that the storage temperature did not affect the zeta potential of the ATRA-loaded ME 4. There was a report showing that the larger negative zeta potential of emulsion droplets was an important factor for emulsion stability.²⁸ According to the microemulsion stability evaluation by Acharya et al,²⁹ their microemulsion formulations had very low zeta potential (about -0.11 mV) similar to our result (about -0.26 mV). However, their microemulsion formulations were still stable for long-term storage (3 months) and accelerated condition (centrifugation). This indicated that the very low negative charge of particles might

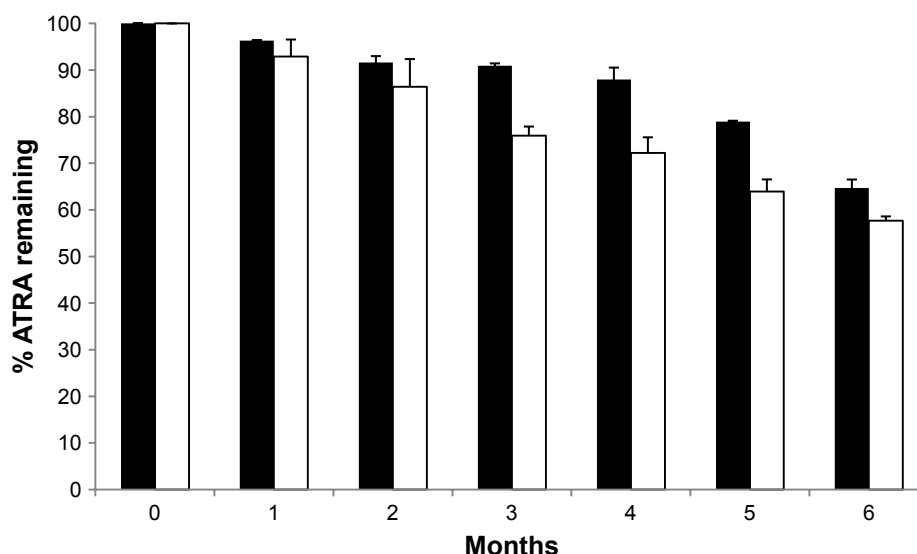


Figure 10 The percentage of ATRA remaining in ME 4 after storage for 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months after preparation at 25°C (■) and 40°C (□). Each value represents the mean \pm standard deviation (n=3).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

Table 7 The mean particle size of ATRA-loaded ME 4 at baseline, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months after preparation stored at 25°C and 40°C

| Temperature (°C) | Size (nm) | | | | | | |
|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Baseline | 1 month | 2 months | 3 months | 4 months | 5 months | 6 months |
| 25 | 167.7 \pm 30.1 | 161.43 \pm 34.67 | 174.53 \pm 35.45 | 163.17 \pm 38.29 | 162.53 \pm 68.26 | 160.77 \pm 36.03 | 152.67 \pm 27.96 |
| 40 | 167.7 \pm 30.1 | 185.8 \pm 35.9 | 212.27 \pm 36.24 | 160.13 \pm 31.58 | 219.6 \pm 79.8 | 199.7 \pm 42.3 | 181.01 \pm 13.86 |

Note: Each value represents the mean \pm standard deviation (n=3).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

Table 8 Zeta potential of ATRA-loaded ME 4 at baseline, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months after preparation stored at 25°C and 40°C

| Temperature (°C) | Zeta potential (mV) | | | | | | |
|------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Baseline | 1 month | 2 months | 3 months | 4 months | 5 months | 6 months |
| 25 | -0.26 \pm 0.15 | -0.21 \pm 0.05 | -0.24 \pm 0.08 | -0.26 \pm 0.17 | -0.22 \pm 0.11 | -0.28 \pm 0.03 | -0.37 \pm 0.06 |
| 40 | -0.26 \pm 0.15 | -0.23 \pm 0.06 | -0.31 \pm 0.06 | -0.26 \pm 0.07 | -0.31 \pm 0.27 | -0.25 \pm 0.08 | -0.22 \pm 0.08 |

Note: Each value represents the mean \pm standard deviation (n=3).

Abbreviations: ATRA, all-trans retinoic acid; ME, microemulsion.

not affect the microemulsion stability. However, the good stability of ATRA-loaded ME 4 might depend on the high viscosity of microemulsion formulation because it contained very low amount of water (5% of total weight).

Conclusions

A novel ATRA-loaded microemulsion containing oleth-5 as the surfactant was successfully prepared. This microemulsion could enhance the intestinal absorption of ATRA. However, the intestinal absorption enhancement depended on the amount of surfactant in the microemulsion formulation. The LDH cytotoxicity test revealed that the cytotoxicity of the

microemulsion containing ATRA to the intestinal membrane did not differ from that of an edible oil (fish oil). The ATRA-loaded microemulsion was stable at 25°C. In summary, this novel microemulsion was an effective and safe delivery system for the oral administration of ATRA.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Thailand Research Funds (grant no MRG6080062) and the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University for the financial support. The authors would like to thank Associate Professor Dr Parnpen Viriyavejakul (MD, PhD) from the Department of Tropical

Pathology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University for histopathological interpretation of the intestinal tissues.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Coombs CC, Tavakkoli M, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer J*. 2015;5:e304.
- Adamson PC. All-trans-retinoic acid pharmacology and its impact on the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Oncologist*. 1996;1(5):305–314.
- Muindi JR, Frankel SR, Huselton C, et al. Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res*. 1992;52(8):2138–2142.
- Qi ZH, Shieh WJ. Aqueous media for effective delivery of tretinoin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2002;44(1):133–136.
- Li Z, Han X, Zhai Y, et al. Critical determinant of intestinal permeability and oral bioavailability of pegylated all trans-retinoic acid prodrug-based nanomicelles: chain length of poly (ethylene glycol) corona. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;130:133–140.
- Sane R, Mittapalli RK, Elmquist WF. Development and evaluation of a novel microemulsion formulation of elacridar to improve its bioavailability. *J Pharm Sci*. 2013;102(4):1343–1354.
- Nornoo AO, Zheng H, Lopes LB, Johnson-Restrepo B, Kannan K, Reed R. Oral microemulsions of paclitaxel: in situ and pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(2):310–317.
- Noble S, Markham A. Cyclosporin. A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral). *Drugs*. 1995;50(5):924–941.
- Ghosh PK, Majithiya RJ, Umrethia ML, Murthy RS. Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(3):77.
- Zhao JH, Ji L, Wang H, et al. Microemulsion-based novel transdermal delivery system of tetramethylpyrazine: preparation and evaluation in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1611–1619.
- Gundogdu E, Alvarez IG, Karasulu E. Improvement of effect of water-in-oil microemulsion as an oral delivery system for fexofenadine: in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1631–1640.
- Fisher S, Wachtel EJ, Aserin A, Garti N. Solubilization of simvastatin and phytosterols in a dilutable microemulsion system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;107:35–42.
- Nolte K, Backfisch G, Neidlein R. In vitro studies of poorly absorbed drugs using porcine intestine in the ring model RIMO. *Arzneimittelforschung*. 2000;50(7):664–668.
- Westerhout J, van de Steeg E, Grossouw D, et al. A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. *Eur J Pharm Sci*. 2014;63:167–177.
- Bader CA, Shandala T, Carter EA, et al. A molecular probe for the detection of polar lipids in live cells. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161557.
- Alama T, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A. Absorption-enhancing effects of gemini surfactant on the intestinal absorption of poorly absorbed hydrophilic drugs including peptide and protein drugs in rats. *Int J Pharm*. 2016;499(1–2):58–66.
- Charoenputtakhun P, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. All-trans retinoic acid-loaded lipid nanoparticles as a transdermal drug delivery carrier. *Pharm Dev Technol*. 2014;19(2):164–172.
- Spernath A, Aserin A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006;128–130:47–64.
- Acharya DP, Hartley PG. Progress in microemulsion characterization. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2012;17:274–280.
- Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;45(1):89–121.
- Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int J Pharm*. 2004;271(1–2):11–19.
- Xing Q, Song J, You X, et al. Microemulsions containing long-chain oil ethyl oleate improve the oral bioavailability of piroxicam by increasing drug solubility and lymphatic transportation simultaneously. *Int J Pharm*. 2016;511(2):709–718.
- Djekic L, Primorac M, Filipic S, Agbaba D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *Int J Pharm*. 2012;433(1–2):25–33.
- Silva AE, Barratt G, Chéron M, Egito ES. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *Int J Pharm*. 2013;454(2):641–648.
- Djordjevic L, Primorac M, Stupar M. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. *Int J Pharm*. 2005;296(1–2):73–79.
- O'Driscoll CM. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2002;15(5):405–415.
- Dai J, Kim SM, Shin IS, et al. Preparation and stability of fucosanthin-loaded microemulsions. *J Ind Eng Chem*. 2014;20(4):2103–2110.
- Chansiri G, Lyons RT, Patel MV, Hem SL. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. *J Pharm Sci*. 1999;88(4):454–458.
- Acharya SP, Pundarikakshudu K, Panchal A, et al. Preparation and evaluation of transnasal microemulsion of carbamazepine. *AJPS*. 2013;8(1):64–70.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.