



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของไมโครนิตเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่านและระบบนำส่ง  
ไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนัง  
และความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีน

โดย รศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวhirัณพัฒน์

มีนาคม ปี พ.ศ. 2555

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของไมโครนีดเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่านและระบบนำส่ง  
ไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนัง  
และความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีน

โดย รศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความคิดเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสำนักงานสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งให้การสนับสนุน  
ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์  
เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีบางส่วน

**รหัสโครงการ** RSA 5280001  
**ชื่อโครงการ** ผลของไมโครนิตเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่านและระบบนำส่งไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีน  
**ชื่อนักวิจัย** รศ.ดร.ชนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ ม.ศิลปากร  
**E-mail address** tanasait@su.ac.th  
**ระยะเวลาโครงการ** 2 มีนาคม 2552- 1 มีนาคม 2555 (3 ปี)

การวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของไมโครนิตเดิ้ลสารเร่งการซึมผ่านและระบบนำส่งนำส่งไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของยาที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เปปไทด์และโปรตีน ในการทดลองเริ่มต้นได้ศึกษาผลของไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา โดยใช้สารลดแรงตึงผิวผสมลงในไลโปโซม พบว่าไลโปโซมชนิดผสมสารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มการกักเก็บยาและการซึมผ่านผิวหนังของตัวยามีล็อกซีแคมได้เนื่องจากไลโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิวสามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการจัดเรียงตัวในชั้นไขมันของสตาร์ทคอร์เนียมที่ผิวหนัง การทดลองต่อไปทำโดยศึกษาผลของไมโครนิตเดิ้ลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านของสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่คือ ฟลูออเรสซินไอโซโทปไอโซยาเนตเดกซ์แทรน โดยศึกษาผลของปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าสู่ผิวหนัง จำนวนครั้งของการฉีดสารเข้าสู่ผิวหนัง ขนาดโมเลกุลของสารที่ฉีด รวมทั้งรูปแบบของตำรับที่ฉีดเข้าสู่ผิวหนัง จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรของการฉีดทำให้ยาผ่านเข้าสู่ผิวหนังเพิ่มขึ้น จำนวนครั้งของการฉีดมีผลเล็กน้อยต่อการซึมผ่าน ขนาดโมเลกุลของสารยังมีขนาดใหญ่ขึ้นการซึมผ่านจะลดลง และการให้ยาในรูปแบบสารละลายให้ผลการซึมผ่านมากกว่าในรูปแบบอิมัลชันและไลโปโซมตามลำดับ จลนศาสตร์การซึมผ่านผิวหนังเป็นแบบฮิกชิ สำหรับการทดลองสุดท้ายเป็นการใช้ไมโครนิตเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่าน และระบบนำส่งแบบไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีน โดยใช้เปปไทด์และโปรตีน 3 ชนิดที่ขนาดโมเลกุลต่างกัน คือ เปปไทด์ 8 อะมิโนแอซิด ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และ โบวินซีรั่มอัลบูมินและเลือกใช้สารเร่งการซึมผ่าน 3 ชนิดคือ เอทานอล เอทานอลผสมเมนทอล และเอทานอลผสมเมนทอลและลิโมนีน ผลการศึกษาพบว่าขนาดโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นทำให้การซึมผ่านลดลง การใช้สารเร่งการซึมผ่านทุกชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนโดยเอทานอลผสมเมนทอลและลิโมนีนจะเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังมากที่สุด การใช้ไมโครนิตเดิ้ลชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การให้ยาในรูปแบบไลโปโซมร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านจะให้ผลเสริมกันในการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีน นอกจากนี้พบว่าการให้ยาในรูปแบบไลโปโซมและสารเร่งการซึมผ่านสามารถรักษาความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีนได้เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน ในการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าสามารถให้ยาที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เปปไทด์และโปรตีนโดยใช้ไมโครนิตเดิ้ลชนิดรูกลวงได้ โดยปัจจัยจากสูตรตำรับเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการส่งผ่านตัวยาเข้าสู่ผิวหนัง

**คำหลัก :** ไมโครนิตเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่าน ไลโปโซม สารโมเลกุลใหญ่ เปปไทด์ โปรตีน

**Project code:** RSA 5280001  
**Project Title:** Effect of microneedle, penetration enhancers and liposome delivery systems on skin permeation and stability of peptide and protein  
**Investigator** Assoc.Prof. Tanasait Ngawhirunpat, Fac.of Pharmacy, Silpakorn U.  
**E-mail address** tanasait@su.ac.th  
**Project Period** 2 March 2009-1 March 2012 (3 years)

In this research, the effect of microneedle, penetration enhancer and liposomes on the skin permeation and stability of macromolecule, peptide and protein was investigated. In the first part, the effect of liposome and liposome incorporated with surfactants on skin permeation of meloxicam was studied. The liposome incorporated with surfactants increased the incorporation efficiency and skin permeation of the drug. These results caused from that surfactants can alter the fluidity of lipid in the stratum corneum of the skin. In the second experiment, the effect of hollow microneedle on the skin permeation fluorescein isothiocyanate dextran (FD) was investigated. The effect of volume of FD injected, the number of injection on the same volume of FD, the molecular weight of FD and the type of formulation (solution, emulsion and liposome) was studied. The results showed that increasing in the volume of injected FD increased the skin permeation. The number of injection slightly influenced the enhancing of the skin permeation of FD. The higher the molecular weight of FD injected, the lower the skin permeation of FD was observed. The solution gave the higher skin permeation than emulsion and liposome, respectively. The kinetic of drug released from the skin to the receptor solution was found to be Higuchi' model. In the final part, the effect of microneedle, penetration enhancer, and liposome on the skin permeation of peptide and protein was evaluated. The peptide and protein used in this study were peptide 8 amino acid, superoxide dismutase and bovine serum albumin. The skin penetration enhancers used were ethanol, ethanol and menthol, and ethanol plus menthol and limonene. The results showed that increasing in the molecular weight of peptide and protein decreased the skin permeation. The use of all penetration enhancers increased the skin permeation of protein. The maximum skin permeation enhancement was found in ethanol plus menthol and limonene. The use of hollow microneedle significantly increased the skin permeation of protein. The synergistic effect for skin permeation of peptide and protein was found in the combination of microneedle and liposome. The good stability was found in the liposome kept at 4°C for 1 month. The microneedle can increase the skin permeation of protein drug, and the formulation factor is the key factor for skin permeation of protein drug.

**Keywords:** Microneedles, Penetration enhancer. Liposome, Macromolecule, Peptide, Protein

## EXECUTIVE SUMMARY

การนำส่งยาทางผิวหนัง (transdermal route) จัดเป็นวิธีทางที่สำคัญอย่างหนึ่งในการนำส่งยานอกเหนือจากการให้ยาในรูปแบบอื่น เช่น รูปแบบรับประทานซึ่งจะพบปัญหาในกรณียาเสื่อมสลายโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและการเกิด first pass metabolism ที่ตับ รูปแบบการฉีดซึ่งพบปัญหาเกี่ยวกับความเจ็บปวดบริเวณที่ฉีดและมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อในระหว่างหรือหลังฉีด เป็นต้น อย่างไรก็ตามการนำส่งยาทางผิวหนังเพื่อให้ได้ระดับยาที่อยู่ในระดับการรักษาเป็นสิ่งที่กระทำได้ด้วยความยากลำบากเนื่องจาก การมีคุณสมบัติกั้นการซึมผ่านของชั้น stratum corneum ที่เป็นองค์ประกอบชั้นนอกสุดของผิวหนังในส่วนหนังกำพร้า (epidermis) ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนและไขมันแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ ดังนั้น สารที่ละลายในน้ำหรือไขมันดีและสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ โดยเฉพาะขนาดมากกว่า 1,000 ดาลตัน จะประสบปัญหาในการนำส่งเข้าสู่ผิวหนังโดยปริมาณการซึมผ่านมักจะมีค่าต่ำมากจนไม่ได้ประสิทธิผลในการรักษา ในปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการเพิ่มหรือปรับปรุงการซึมผ่านของสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เช่น การใช้สารเร่งการซึมผ่าน (penetration enhancer) การใช้กระแสไฟฟ้า (iontophoresis) การใช้คลื่นเสียง (phonophoresis) การใช้ไมโครนีดเดิล (microneedle) เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะรบกวนโครงสร้างของ stratum corneum ซึ่งเป็นตัวกั้นผ่านที่สำคัญที่สุดของผิวหนัง โดยทำให้เกิดรูที่มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะให้โมเลกุลของยาผ่านชั้น stratum corneum ไปได้ โดยมักจะทำให้เกิดรูที่มีขนาดในระดับนาโนเมตรยกเว้นกรณีไมโครนีดเดิล (microneedle) ซึ่งจะทำให้เกิดรูที่มีขนาดในระดับไมโครเมตรแต่อย่างไรก็ตามทุกวิธีการไม่ก่อให้เกิดการทำลายของชั้น stratum corneum อย่างถาวร

ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ไมโครนีดเดิลในการศึกษาการซึมผ่านของตัวยา นอกจากนี้การศึกษานำส่งสารหรือยาที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น เปปไทด์และโปรตีนเข้าสู่ทางผิวหนังแม้ว่าจะมีรายงานว่าสามารถกระทำได้โดยใช้ไมโครนีดเดิล อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวเป็นวิธีการทำที่ค่อนข้างใหม่ในสาขาวิจัยด้านการนำส่งยาทางผิวหนัง การใช้ไมโครนีดเดิลสำหรับการนำส่งสารโมเลกุลขนาดใหญ่จัดเป็นเทคนิคที่ปฏิวัติระบบนำส่งยาที่ใช้ในทางผิวหนังมาทั้งหมดเนื่องจากไม่มีการเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนังวิธีใดๆที่จะเพิ่มการนำส่งสารหรือยาโมเลกุลขนาดใหญ่ให้ได้รับระดับยาที่ใช้ในการรักษาจากการใช้ไมโครนีดเดิล โดยมีรายงานการพัฒนาระบบไมโครนีดเดิลเพื่อนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาครั้งแรกในปี 1998 โดย Henry และคณะ ไมโครนีดเดิลเป็นระบบนำส่งที่ใช้กับผิวหนังที่ประกอบด้วยเข็มที่มีขนาดเล็กกระดัดไมโครเมตรหรือนาโนเมตรอาจทำด้วยโลหะหรือซิลิคอนแทรกอยู่ในเนื้อของพอลิเมอร์ (รูปที่ 1) เข็มดังกล่าวที่จะเข้าสู่ผิวหนังมีความยาวประมาณ 100-500 ไมโครเมตรซึ่งความลึกระดับดังกล่าวจะอยู่ในชั้นของหนังกำพร้าซึ่งไม่มีเส้นเลือดหรือเส้นประสาทมาหล่อเลี้ยงทำให้การใช้ไมโครนีดเดิลเพื่อนำส่งยานั้นไม่เกิดความเจ็บปวดเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการฉีดยา การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ไมโครนีดเดิลตั้งแต่ปี 1998-2008 มีทั้งการพัฒนาารูปแบบของเข็มโดยใช้วัสดุชนิดต่างๆ การใช้ไมโครนีดเดิลรูปแบบต่างๆร่วมกับ

ยาและสารขนาดโมเลกุลใหญ่ชนิดต่างๆ หรือแม้กระทั่งการศึกษาวิธีการใช้ไมโครนีดเดิ้ลที่ทำให้เกิดการงอพับของผิวหนังน้อยที่สุด เป็นต้น

สำหรับการพัฒนาระบบไมโครนีดเดิ้ลในการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ มีรายงานเริ่มต้นขึ้นใน ปี 2002 โดย Mitszta และคณะศึกษาการนำส่ง plasmid DNA encoding Luciferase โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลหลังจากนั้นระหว่างปี 2003-2008 มีการพัฒนาให้นำส่งขนาดสารโมเลกุลหลายชนิด เช่น อินซูลิน Bovine serum albumin, antisense oligonucleotide เป็นต้น การวิจัยเกี่ยวกับการนำไมโครนีดเดิ้ลมาใช้ในการนำส่งสารหรือยาโมเลกุลใหญ่จึงมีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จสูงกว่าวิธีการอื่นๆ อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านผิวหนังของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่ โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล เช่น ขนาดโมเลกุลของยา ความคงตัวของยาระหว่างการซึมผ่าน ฯลฯ อันเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบนี้ ยังไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบ

ในปัจจุบันมีความพยายามเพิ่มการซึมผ่านของสารโมเลกุลใหญ่โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับการเพิ่มการซึมผ่านวิธีการอื่นๆ เช่น การใช้กระแสไฟฟ้า โดยในปี 2007 Wu และคณะ ได้รายงานเกี่ยวกับการประยุกต์ร่วมระหว่างการใช้ไมโครนีดเดิ้ลและกระแสไฟฟ้า (iontophoresis) เพื่อเพิ่มการซึมผ่านของ fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ผิวหนังของหนูซึ่งพบว่าการใช้การเพิ่มการซึมผ่าน 2 วิธีร่วมกันสามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ผิวหนังมากกว่าการใช้ไมโครนีดเดิ้ลหรือการใช้กระแสไฟฟ้าเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังโดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับ การใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เร่งการซึมผ่าน (chemical enhancer) มีความเป็นไปได้สูงที่จะช่วยเพิ่มการซึมผ่านสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ผิวหนัง เนื่องจากการเพิ่มการซึมผ่านโดยใช้สารเร่งการซึมผ่านผิวหนังบางกลุ่มเช่น menthol, alcohol และ terpenes บางชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้มากถึง 20 เท่าเทียบกับผิวหนังปกติ โดยในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังสำหรับสารโมเลกุลใหญ่เช่นกัน ในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ของการทำวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาการใช้ไมโครนีดเดิ้ล การใช้สารเร่งการซึมผ่าน (penetration enhancer) ร่วมกับรูปแบบระบบนำส่งแบบไลโปโซมในการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านและความคงตัวของสารขนาดโมเลกุลใหญ่ในกลุ่มเปปไทด์และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน

ในการทดลองเริ่มต้นได้ศึกษาผลของไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา โดยใช้สารลดแรงตึงผิวผสมลงในไลโปโซม พบว่าไลโปโซมชนิดผสมสารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มการกักเก็บยาและการซึมผ่านผิวหนังของตัวยามีลักษณะแคบได้เนื่องจากไลโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิวสามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการจัดเรียงตัวในชั้นไขมันของสตราตัมคอร์เนียมที่ผิวหนัง การทดลองต่อไปทำโดยศึกษาผลของไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านของสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่คือ ฟลูออเรสเซินไอโซไทโอไซยานาตเตคซ์แทรน โดยศึกษาผลของปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าสู่ผิวหนัง จำนวนครั้งของการฉีดสารเข้าสู่ผิวหนัง ขนาดโมเลกุลของสารที่ฉีด รวมทั้งรูปแบบของตำรับที่ฉีดเข้าสู่ผิวหนัง จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาตรของการฉีดทำให้ยาผ่านเข้าสู่ผิวหนังเพิ่มขึ้น จำนวน

ครั้งของการฉีดมีผลเล็กน้อยต่อการซึมผ่าน ขนาดโมเลกุลของสารยิ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นการซึมผ่านจะลดลง และการให้ยาในรูปแบบสารละลายให้ผลการซึมผ่านมากกว่าในรูปแบบอิมัลชันและไลโปโซมตามลำดับ จลนศาสตร์การซึมผ่านผิวหนังเป็นแบบอิกูซี สำหรับการทดลองสุดท้ายเป็นการใช้ไมโครนีดเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่าน และระบบนำส่งแบบไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีน โดยใช้เปปไทด์และโปรตีน 3 ชนิดที่ขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน คือ เปปไทด์ 8 อะมิโนแอซิด ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และ โบวินซีรั่มอัลบูมินและเลือกใช้สารเร่งการซึมผ่าน 3 ชนิดคือ เอธานอล เอธานอลผสมเมนทอล และเอธานอลผสมเมนทอลและลิโมนีน ผลการศึกษาพบว่าขนาดโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นทำให้การซึมผ่านลดลง การใช้สารเร่งการซึมผ่านทุกชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนโดยเอธานอลผสมเมนทอลและลิโมนีนจะเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังมากที่สุด การใช้ไมโครนีดเดิ้ลชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การให้ยาแบบไลโปโซมร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านจะให้ผลเสริมกันในการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีน นอกจากนี้พบว่าการใช้ยาในรูปแบบไลโปโซมและสารเร่งการซึมผ่านสามารถรักษาความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีนได้เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน ในการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าสามารถให้ยาที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เปปไทด์และโปรตีนโดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวงได้ โดยปัจจัยจากสูตรตำรับเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการส่งผ่านตัวยเข้าสู่ผิวหนัง



## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
Executive summary	5
สารบัญเรื่อง	8
สารบัญตาราง	9
สารบัญภาพ	10
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	11
บทนำ	12
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	12
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	14
- ขอบเขตของการวิจัย	14
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	15
วิธีการดำเนินการวิจัย	18
- สารเคมี	18
- เครื่องมือและอุปกรณ์	18
- ระเบียบวิธีวิจัย	19
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	23
เอกสารอ้างอิง	44
OUTPUTS ที่ได้จากโครงการ	47
ภาคผนวก	48

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สูตรตำรับของไลโปโซม	21
ตารางที่ 2 ขนาดและความเป็นประจุของไลโปโซม	25
ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์ของ FD-4 ที่ผ่านผิวหน้าที่ 8 h หลังฉีดยาด้วยไมโครนีดเดิ้ล	33
ตารางที่ 4 ค่าคงที่การปลดปล่อยตัวยา FD-4 FD-4 ที่ผ่านผิวหน้าที่ 8 h หลังฉีดยาด้วยไมโครนีดเดิ้ล	35
ตารางที่ 5 กลไกการปลดปล่อยของ bovine serum albumin จากผิวหน้า	39
ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์ของอัลบูมินที่ยังคงอยู่ในตำรับในแต่ละสูตรตำรับเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ	42

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 Scanning electron microscope ของไมโครนิดเดิ้ล	13
รูปที่ 2 การเตรียม hollow microneedles	21
รูปที่ 3 Transmission electron microscopy ของมีล็กซีแคมที่บรรจุในไลโปโซม	24
รูปที่ 4 ผลของปริมาณยา ที่บรรจุในไลโปโซมต่อ entrapment efficiency และ loading efficiency	26
รูปที่ 5 เปอร์เซนต์ของยามีล็กซีแคมที่ยังคงอยู่ในตำรับในแต่ละสูตรตำรับ	27
รูปที่ 6 ปริมาณยาที่ซึมผ่านผิวหนังที่เวลา 24 ชั่วโมงของไลโปโซมสูตรตำรับต่างๆ	28
รูปที่ 7 FT-IR spectra และ DSC ของผิวหนังหลังจากการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	29
รูปที่ 8 ผลของปริมาตรที่ฉีด FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา	31
รูปที่ 9 ผลของการฉีด 10 ไมโครลิตร 1 ครั้ง ของ FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา	32
รูปที่ 10 ผลของการฉีด 5 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ของ FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา	32
รูปที่ 11 ผลของการฉีด 2.5 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ของ FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา	33
รูปที่ 12 การซึมผ่านของระบบนำส่งยาต่างๆคือ สารละลาย อิมัลชันและไลโปโซม	34
รูปที่ 13 Higuchi plot ของการฉีด FD-4 ในจำนวนครั้งที่แตกต่างกันต่อการซึมผ่านตัวยา	35
รูปที่ 14 Histology ของการฉีด Fluoresceine isothiocyanate dextran-4 ในผิวหนังหนู	36
รูปที่ 15 กลไกการปลดปล่อยของ bovine serum albumin จากผิวหนัง	39
รูปที่ 16 การปลดปล่อยของ bovine serum albumin จากผิวหนังในปริมาตรที่ฉีดแตกต่างกัน	39
รูปที่ 17 ผลของขนาดโมเลกุลของเปปไทด์และโปรตีนต่อการซึมผ่านผิวหนังโดยใช้ไมโครนิดเดิ้ล	40
รูปที่ 18 ผลของสารเร่งการซึมผ่านในการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์ 8 อะมิโนแอซิด	40
รูปที่ 19 ผลของสารเร่งการซึมผ่านในการซึมผ่านผิวหนังซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส	41
รูปที่ 20 ผลของสารเร่งการซึมผ่านในการซึมผ่านผิวหนังในการซึมผ่านของอัลบูมิน	41
รูปที่ 21 ผลของสารเร่งการซึมผ่าน 3 ชนิดและการใช้ไมโครนิดเดิ้ลในการซึมผ่านผิวหนังของอัลบูมิน	42

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย**

HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
hr, h	=	hour
mcg	=	microgram
cm <sup>2</sup>	=	square centimeter
SC	=	stratum corneum
FD	=	fluoresceine isothiocyanate dextran

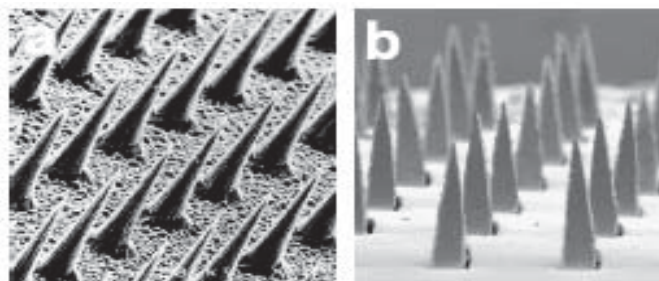
## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การนำส่งยาทางผิวหนัง (transdermal route) จัดเป็นวิธีทางที่สำคัญอย่างหนึ่งในการนำส่งยานอกเหนือจากการให้ยาในรูปแบบอื่น เช่น รูปแบบรับประทานซึ่งจะพบปัญหาในกรณียาเสื่อมสลายโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและการเกิด first pass metabolism ที่ตับ รูปแบบการฉีดซึ่งพบปัญหาเกี่ยวกับความเจ็บปวดบริเวณที่ฉีดและมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อในระหว่างหรือหลังฉีด เป็นต้น อย่างไรก็ตามการนำส่งยาทางผิวหนังเพื่อให้ได้ระดับยาที่อยู่ในระดับการรักษาเป็นสิ่งที่กระทำได้ด้วยความยากลำบากเนื่องจาก การมีคุณสมบัติกั้นการซึมผ่านของชั้น stratum corneum ที่เป็นองค์ประกอบชั้นนอกสุดของผิวหนังในส่วนหนังกำพร้า (epidermis) ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนและไขมันแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ ดังนั้น สารที่ละลายในน้ำหรือไขมันดีและสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ โดยเฉพาะขนาดมากกว่า 1,000 ดาลตัน จะประสบปัญหาในการนำส่งเข้าสู่ผิวหนังโดยปริมาณการซึมผ่านมักจะมีค่าต่ำมากจนไม่ได้ประสิทธิผลในการรักษา ในปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการเพิ่มหรือปรับปรุงการซึมผ่านของสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เช่น การใช้สารเร่งการซึมผ่าน (penetration enhancer) การใช้กระแสไฟฟ้า (iontophoresis) การใช้คลื่นเสียง (phonophoresis) การใช้ไมโครนีดเดิล (microneedle) เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะรบกวนโครงสร้างของ stratum corneum ซึ่งเป็นตัวกั้นผ่านที่สำคัญที่สุดของผิวหนัง โดยทำให้เกิดรูที่มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะให้โมเลกุลของยาผ่านชั้น stratum corneum ไปได้ โดยมักจะทำให้เกิดรูที่มีขนาดในระดับนาโนเมตรยกเว้นกรณีไมโครนีดเดิล (microneedle) ซึ่งจะทำให้เกิดรูที่มีขนาดในระดับไมโครเมตรแต่อย่างไรก็ตามทุกวิธีการไม่ก่อให้เกิดการทำลายของชั้น stratum corneum อย่างถาวร

ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ไมโครนีดเดิลในการศึกษาการซึมผ่านของตัวยา นอกจากนี้การศึกษานำส่งสารหรือยาที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น เปปไทด์และโปรตีนเข้าสู่ทางผิวหนังแม้ว่าจะมีรายงานว่าสามารถกระทำได้โดยใช้ไมโครนีดเดิล อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวเป็นวิธีการทำที่ค่อนข้างใหม่ในสาขาวิจัยด้านการนำส่งยาทางผิวหนัง การใช้ไมโครนีดเดิลสำหรับการนำส่งสารโมเลกุลขนาดใหญ่จัดเป็นเทคนิคที่ปฏิวัติระบบนำส่งยาที่ใช้ในทางผิวหนังมาทั้งหมดเนื่องจากไม่มีการเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนังวิธีใดๆที่จะเพิ่มการนำส่งสารหรือยาโมเลกุลขนาดใหญ่ให้ได้รับระดับยาที่ใช้ในการรักษาจากการใช้ไมโครนีดเดิล โดยมีรายงานการพัฒนาระบบไมโครนีดเดิลเพื่อนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาครั้งแรกในปี 1998 โดย Henry และคณะ ไมโครนีดเดิลเป็นระบบนำส่งที่ใช้กับผิวหนังที่ประกอบด้วยเข็มที่มีขนาดเล็กระดับไมโครเมตรหรือนาโนเมตรอาจทำด้วยโลหะหรือซิลิคอนแทรกอยู่ในเนื้อของพอลิเมอร์ (รูปที่ 1) เข็มดังกล่าวที่จะเข้าสู่ผิวหนังมีความยาวประมาณ 100-500 ไมโครเมตรซึ่งความลึกระดับดังกล่าวจะอยู่ในชั้นของหนังกำพร้าซึ่งไม่มีเส้นเลือดหรือเส้นประสาทมาหล่อเลี้ยงทำให้การใช้ไมโครนีดเดิลเพื่อนำส่งยานั้นไม่เกิดความเจ็บปวดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการฉีดยา การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ไมโครนีดเดิลตั้งแต่ปี 1998-2008 มีทั้งการพัฒนาารูปแบบของเข็มโดยใช้วัสดุชนิดต่างๆ การใช้ไมโครนีดเดิลรูปแบบต่างๆร่วมกับ

ยาและสารขนาดโมเลกุลใหญ่ชนิดต่าง ๆ หรือแม้กระทั่งการศึกษาวิธีการใช้ไมโครนีดเดิ้ลที่ทำให้เกิดการงอพับของผิวหนังน้อยที่สุด เป็นต้น



รูปที่ 1 แสดง Scanning electron microscope ของไมโครนีดเดิ้ล (a) ไมโครนีดเดิ้ลความยาว 150 ไมโครเมตรที่เตรียมจากโลหะซิลิคอน (b) ไมโครนีดเดิ้ลความยาว 1000 ไมโครเมตรที่เตรียมจากสแตนเลสสตีล

สำหรับการพัฒนาระบบไมโครนีดเดิ้ลในการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ มีรายงานเริ่มต้นขึ้นใน ปี 2002 โดย Mitszta และคณะศึกษาการนำส่ง plasmid DNA encoding Luciferase โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลหลังจากนั้นระหว่างปี 2003-2008 มีการพัฒนาใช้ นำส่งขนาดสารโมเลกุลหลายชนิด เช่น อินซูลิน Bovine serum albumin, antisense oligonucleotide เป็นต้น การวิจัยเกี่ยวกับการนำไมโครนีดเดิ้ลมาใช้ในการนำส่งสารหรือยาโมเลกุลใหญ่จึงมีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จสูงกว่าวิธีการอื่นๆ อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านผิวหนังของสาร หรือยาโมเลกุลใหญ่ โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล เช่น ขนาดโมเลกุลของยา ความคงตัวของยาระหว่างการซึมผ่าน ฯลฯ อันเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบนี้ ยังไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบ

ในปัจจุบันมีความพยายามเพิ่มการซึมผ่านของสารโมเลกุลใหญ่โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล ร่วมกับการเพิ่มการซึมผ่านวิธีการอื่นๆ เช่น การใช้กระแสไฟฟ้า โดยในปี 2007 Wu และคณะ ได้ รายงานเกี่ยวกับการประยุกต์ร่วมระหว่างการใช้ไมโครนีดเดิ้ลและกระแสไฟฟ้า (iontophoresis) เพื่อเพิ่มการซึมผ่านของ fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ ผิวหนังของหนูซึ่งพบว่าการใช้การเพิ่มการซึมผ่าน 2 วิธีร่วมกันสามารถเพิ่มการซึมผ่านของสาร โมเลกุลใหญ่เข้าสู่ผิวหนังมากกว่าการใช้ไมโครนีดเดิ้ลหรือการใช้กระแสไฟฟ้าเพียงอย่างเดียวอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ การเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังโดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับ การใช้ สารเคมีที่มีฤทธิ์เร่งการซึมผ่าน (chemical enhancer) มีความเป็นไปได้สูงที่จะช่วยเพิ่มการซึมผ่าน สารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ผิวหนัง เนื่องจากการเพิ่มการซึมผ่านโดยใช้สารเร่งการซึมผ่านผิวหนังบางกลุ่ม เช่น menthol, alcohol และ terpenes บางชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้มากถึง 20 เท่า เทียบกับผิวหนังปกติ โดยในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับ สารเร่งการซึมผ่านผิวหนังสำหรับสารโมเลกุลใหญ่เช่นกัน

แม้ว่าปัจจุบันมีรายงานการใช้ไมโครนีดเดิ้ลเพื่อช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่หลายชนิด แต่ยังไม่มียาหรือนวัตกรรมการศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่เหล่านี้เมื่อให้ทางผิวหนัง โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล ชนะเศรษฐ์และคณะ (2007) พบว่าเอนไซม์ในผิวหนังสามารถเปลี่ยนแปลงตัวยาสำคัญทำให้ประสิทธิภาพของบรรพเภสัชลดลงและอาจไม่ได้ผลในการรักษา สารหรือยาในกลุ่มเปปไทด์และโปรตีน สามารถถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ในผิวหนังได้เช่น peptidase และ proteinase ซึ่งสามารถทำลายเปปไทด์และโปรตีนได้ตามลำดับ ดังนั้นในการพัฒนาให้สารกลุ่มดังกล่าวมีความคงตัวเพิ่มขึ้นสามารถทำได้โดยการเตรียมให้อยู่ในรูปแบบระบบนำส่งแบบอนุภาคไมโคร/นาโน (micro/nanoparticle delivery system) เช่น ไลโปโซม ไมเซลล์ ฯลฯ มีรายงานว่าอนุภาคระดับไมครอนสามารถผ่านเข้าสู่ผิวหนังทั้งอนุภาคได้โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับรูปแบบระบบนำส่งแบบอนุภาคไมโคร/นาโนในการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านและความคงตัวของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่ นอกจากนี้การใช้ไมโครนีดเดิ้ล ร่วมกับสารเร่งการซึมผ่าน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านและความคงตัวของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่ที่บรรจุในระบบนำส่งยาแบบอนุภาคไมโคร/นาโน ยังไม่มีผู้ศึกษาวิจัยเช่นกัน จากช่องว่างเกี่ยวกับความรู้ทางวิชาการต่างๆที่กล่าวมาในข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ของการทำวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาการใช้ไมโครนีดเดิ้ล การใช้สารเร่งการซึมผ่าน (penetration enhancer) ร่วมกับรูปแบบระบบนำส่งแบบไลโปโซมในการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านและความคงตัวของสารขนาดโมเลกุลใหญ่ในกลุ่มเปปไทด์และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของการใช้ไมโครนีดเดิ้ลต่อประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กัน
2. ศึกษาผลของการใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังต่อประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของของเปปไทด์และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กัน
3. ศึกษาผลของการใช้ไมโครนีดเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง และ ระบบนำส่งแบบไลโปโซมต่อการประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีน

### ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นศึกษาผลของการใช้ไมโครนีดเดิ้ล สารเร่งการซึมผ่าน และระบบนำส่งแบบไลโปโซมต่อการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีน ในการศึกษาดังกล่าวจะเลือกใช้เปปไทด์และโปรตีน 3 ชนิดคือ peptide 8 amino acid (KKKKKKKK), superoxide dismutase และ bovine serum albumin เป็นตัวแทนสารและยาเปปไทด์และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆกัน และเลือกใช้สารเร่งการซึมผ่าน 3 ชนิดคือ ethanol, ethanol + menthol และ ethanol+ menthol + limonene เป็นตัวแทนของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง ในการศึกษาจะพิจารณาผลการซึมผ่านของเปปไทด์และ

โปรตีนผ่านผิวหนังมนุษย์โดยศึกษาจากผลของปัจจัยต่างๆ 4 ปัจจัยคือ 1. กรณีไม่ได้มีการใช้ไมโครนีดเดิลหรือสารเร่งการซึมผ่าน 2. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนีดเดิลเพียงอย่างเดียว 3. กรณีใช้สารเร่งการซึมผ่านเพียงอย่างเดียว และ 4. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนีดเดิลเพียงร่วมกับการให้สารเร่งการซึมผ่านร่วมกัน โดยทุกกรณีจะทำการศึกษาผลของระบบนำส่งไลโปโซมต่อความคงตัวและการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนคือที่ใช้และไม่ใช้ไลโปโซมที่บรรจุเปปไทด์หรือโปรตีนเป็นระบบนำส่ง

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลของการใช้ไมโครนีดเดิลต่อประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กัน
2. ทราบผลของการใช้ไมโครนีดเดิลร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังต่อประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของของเปปไทด์และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กัน
3. ทราบผลของการใช้ไมโครนีดเดิล สารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง และ ระบบนำส่งแบบไลโปโซมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังและความคงตัวของเปปไทด์และโปรตีน

### การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

ไมโครนีดเดิลเป็นระบบที่ประกอบด้วยเข็มที่มีขนาดเล็กระดับไมโครเมตรหรือนาโนเมตรอาจทำด้วยโลหะหรือซิลิโคนแทรกอยู่ในเนื้อของพอลิเมอร์ เข็มดังกล่าวที่เจาะเข้าสู่ผิวหนังมีความยาวประมาณ 100-500 ไมโครเมตรซึ่งความลึกระดับดังกล่าวจะอยู่ในชั้นของหนังกำพร้าซึ่งไม่มีเส้นเลือดหรือเส้นประสาทมาหล่อเลี้ยงทำให้การใช้ไมโครนีดเดิลเพื่อนำส่งยานี้ไม่ทำให้เกิดความเจ็บปวดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการฉีดยา มีการรายงานการพัฒนาระบบไมโครนีดเดิลเพื่อนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาครั้งแรกในปี 1998 โดย Henry และคณะ 3) การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ไมโครนีดเดิลตั้งแต่ปี 1998-2008 มีทั้งการพัฒนาแบบของเข็มโดยใช้วัสดุชนิดต่างๆ เช่น โลหะ 4) และการใช้พอลิเมอร์ชนิดต่างๆ รูปแบบการใช้ไมโครนีดเดิลรูปแบบอื่นๆ ร่วมกับยาเช่น การเคลือบตัวเข็มด้วยยาก่อนแะระบบนำส่ง ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อระบบนำส่งไมโครนีดเดิล หรือแม้กระทั่งการศึกษาวิธีการให้ไมโครนีดเดิลที่ทำให้เกิดการงอพับของผิวหนังน้อยที่สุด เป็นต้น และในช่วงดังกล่าวมีรายงานเกี่ยวกับการพัฒนาระบบดังกล่าวในการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาและสารโมเลกุลขนาดใหญ่หลายชนิดเช่น diclofenac<sup>4</sup>), methyl nicotinate, calcein, demopressin, 5-aminolevulinic acid, naltrexone, albumin , ovalbumin, insulin, oligonucleotide, antigen vaccine, gene และ plasmid DNA เป็นต้น

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกให้ความสนใจกับการนำส่งสารหรือยาในกลุ่มที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยาโปรตีน เพื่อใช้ในการรักษาโรค การนำส่งยาดังกล่าวเข้าสู่ร่างกาย นอกจากวิธีฉีดยาแล้ว การให้ยาทางผิวหนังโดยไมโครนีดเดิลยังเป็นอีกวิธีการให้ยาที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการนำส่งสารหรือ



ยาโมเลกุลใหญ่โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลดังกล่าวเริ่มมีการรายงานเมื่อไม่นานก่อนหน้านี้ โดยปี 2002 Miksza และคณะ Mitsza และคณะศึกษาการนำส่ง plasmid DNA encoding Luciferase โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลและพบว่าการแสดงออกของยีน คือ สร้างเอนไซม์ Luciferase มากกว่าการให้ plasmid DNA ทางผิวหนังโดยไม่ได้อาศัยไมโครนีดเดิ้ลถึง 2,500 เท่า Martriano และคณะ ประยุกต์การนำส่งวัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูโดยใช้ระบบไมโครนีดเดิ้ลเป็นผลสำเร็จ ปี 2003 Martanto และคณะ ครั้งแรกเกี่ยวกับการใช้ไมโครนีดเดิ้ลในการนำส่งอินซูลินเข้าสู่ผิวหนังเป็นเวลา 4 ชั่วโมงในหนูโรวินที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานและพบว่า ระดับกลูโคสในหนูลดลงถึง 80 เปอร์เซ็นต์จากระดับกลูโคสเริ่มต้น ปี 2005 Davis และคณะ ศึกษาการใช้เข็มโลหะชนิดรูกลวง (Hollow metal microneedle) ให้อินซูลินเข้าสู่หนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานและพบว่าให้ประสิทธิภาพการลดน้ำตาลลงถึง 75 เปอร์เซ็นต์จากน้ำตาลเริ่มต้น การวิจัยเกี่ยวกับการนำไมโครนีดเดิ้ลมาใช้ในการนำส่งสารหรือยาโมเลกุลใหญ่จึงมีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จสูงกว่าวิธีการอื่นๆ อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านผิวหนังของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่ โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล เช่น ขนาดโมเลกุลของยา ความคงตัวของยาระหว่างการซึมผ่าน ฯลฯ อันเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบนี้ ยังไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบ

ในปัจจุบันมีความพยายามเพิ่มการซึมผ่านของสารโมเลกุลใหญ่โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล ร่วมกับการเพิ่มการซึมผ่านอื่นๆ เช่น การใช้กระแสไฟฟ้า โดยในปี 2007 โดย Wu และคณะ ได้รายงานเกี่ยวกับการประยุกต์ร่วมระหว่างการใช้ไมโครนีดเดิ้ลและกระแสไฟฟ้า (iontophoresis) เพื่อเพิ่มการซึมผ่านของ fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ผิวหนังของหนูซึ่งพบว่าการใช้การเพิ่มการซึมผ่าน 2 วิธีร่วมกันสามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ผิวหนังมากกว่าการใช้ไมโครนีดเดิ้ลหรือการใช้กระแสไฟฟ้าเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจากการเพิ่มการซึมผ่านโดยวิธีการประยุกต์ร่วมระหว่างไมโครนีดเดิ้ลกับการเพิ่มการซึมผ่านวิธีอื่นยังไม่มีผู้ศึกษาวิจัย และการเพิ่มปริมาณการซึมผ่านที่สูงขึ้นอาจทำให้ขนาดยาที่ใช้ในการนำส่งลดลงอันจะเป็นการลดต้นทุนของการนำส่งสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ได้ นอกจากการใช้กระแสไฟฟ้าแล้วยังมีวิธีอื่นๆที่สามารถให้ร่วมกับไมโครนีดเดิ้ลได้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนัง เช่น การใช้สารเร่งการซึมผ่าน เนื่องจากการเพิ่มการซึมผ่านโดยใช้สารเร่งการซึมผ่านผิวหนังบางระบบเช่น ระบบที่ประกอบด้วย menthol และ terpenes บางชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาได้มากถึง 20 เท่าเทียบกับผิวหนังปกติ และในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังสำหรับสารโมเลกุลใหญ่จึงเป็นหัวข้อการวิจัยที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยต่อไป

แม้ว่าจะสามารถใช้ไมโครนีดเดิ้ลในการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาและสารโมเลกุลใหญ่หลายชนิด ในปัจจุบันเทคนิคการเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านของสารกลุ่มดังกล่าวมักไม่ได้คำนึงถึงความคงตัวของสารสำคัญทำให้ประสิทธิภาพการนำส่งยาในรูปแบบดังกล่าวอาจไม่ได้ประสิทธิภาพตามต้องการ ธาระเศรษฐ์และคณะ พบว่าเอนไซม์ในผิวหนังสามารถเปลี่ยนแปลงตัวยาคสำคัญทำให้ประสิทธิภาพของบรรพเภสัชลดลงและอาจไม่ได้ผลในการรักษา สารหรือยาในกลุ่มเปป

ไทด์และโปรตีน สามารถถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ในผิวหนังได้เช่น peptidase และ proteinase ซึ่งสามารถทำลายเปปไทด์และโปรตีนได้ตามลำดับ ดังนั้นในการพัฒนาให้สารกลุ่มดังกล่าวมีความคงตัวเพิ่มขึ้นสามารถทำได้โดยการเตรียมให้อยู่ในรูปแบบระบบนำส่งแบบอนุภาคไมโคร/นาโน (micro/nanoparticle delivery system) เช่น ไลโปโซม ไมเซลล์ ฯลฯ McAllister และคณะ รายงานว่าอนุภาคระดับไมครอนสามารถผ่านเข้าสู่ผิวหนังทั้งอนุภาคได้โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ล อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้ไมโครนีดเดิ้ลร่วมกับรูปแบบระบบนำส่งแบบอนุภาคไมโคร/นาโนในการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านและความคงตัวของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่ นอกจากนี้การใช้ ไมโครนีดเดิ้ล ร่วมกับสารเร่งการซึมผ่าน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านและความคงตัวของสารหรือยาโมเลกุลใหญ่ที่บรรจุในระบบนำส่งยาแบบอนุภาคไมโคร/นาโน ยังไม่มีผู้ศึกษาวิจัยเช่นกัน จากช่องว่างเกี่ยวกับความรู้ทางวิชาการต่างๆที่กล่าวมาในข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ของการทำวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาการใช้ไมโครนีดเดิ้ล การใช้สารเร่งการซึมผ่าน (penetration enhancer) ร่วมกับรูปแบบระบบนำส่งแบบไลโปโซมในการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านและความคงตัวของสาร ขนาดโมเลกุลใหญ่ในกลุ่มเปปไทด์และโปรตีน

## วิธีดำเนินการวิจัย

### สารเคมี

$\gamma$ -orezanol (Sigma, USA)  
 Phosphatidylcholine (Sigma, USA)  
 Cholesterol (Sigma, USA)  
 Sodium taurocholate (Sigma, USA)  
 Fetal bovine serum albumin (Sigma, USA)  
 peptide 8 amino acid (KKKKKKKK), (Sigma, USA)  
 superoxide dismutase (Sigma, USA)  
 Fluoresceine isothiocyanate (Sigma, USA)  
 1,2 Dimyristoyl-sn-glycero-3phosphocholine (Sigma, USA)  
 Propylene glycol monocaprylic ester (Sigma, USA)  
 Polyoxyethylene 60 hydrogenated castor oil (Sigma, USA)  
 Ketoprofen (Sigma, USA)  
 Deuterium oxide (Sigma, USA)  
 Cetyl trimethyl ammonium bromide (Sigma, USA)  
 Tween 80 (Nisshin Flour Milling, Japan)  
 Sodium lauryl sulfate (Tokyo Kasei Kagyo, Japan)  
 Methanol (E Merck, Germany)  
 Methyl paraben (Sigma, USA)  
 Phosphoric acid (Carlo Erba, Italy)  
 Propylene glycol (Carlo Erba, Italy)  
 Glycerine (Carlo Erba, Italy)  
 Sodium chloride (E Merck, Germany)  
 Acetonitrile (E Merck, Germany)  
 Sodium hydroxide (E Merck, Germany)  
 Potassium dihydrogen phosphate (Carlo Erba, Italy)  
 Monobasic sodium phosphate (E Merck, Germany)  
 Dibasic sodium phosphate (E Merck, Germany)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

Hollow microneedles, Nanopass (33 gauge hypodermic needle)  
 Controlled temperature water bath

Dessicator

Side by side diffusion cell (Crown Bio Scientific Inc., USA)

Glass syringe

UV spectrophotometry (Hitachi, Tokyo, Japan)

pH Meter

Magnetic stirrer

High Performance Liquid Chromatography (Perkin Elmer, USA)

Hot air oven

กระดาษกรอง (0.45 ไมครอน)

หลอดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่าง

Guard column for HPLC (Perkin Elmer, USA)

## ระเบียบวิธีวิจัย

### 1. การเตรียมและประเมินคุณลักษณะของยาในรูปแบบไลโปโซม

1.1 เตรียมไลโปโซมโดยใช้วิธี reverse phase โดยใช้ methanol : chloroform เป็นตัวทำละลาย และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยา (ตารางที่ 1) เปปไทด์หรือโปรตีนที่ใช้ในการทดสอบ 3 ความเข้มข้น หลังจากนั้นทำการวัดขนาดและประจุของไลโปโซมและการหาปริมาณที่บรรจุ และ % yield ของยาที่อยู่ในไลโปโซม วัดขนาดและประจุของไลโปโซม โดยโดยใช้เครื่อง Zetasizer และนำสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่อยู่ในไลโปโซม ที่เตรียมได้ มาเติมสารละลาย Triton-X เพื่อทำให้ยา ที่อยู่ในไลโปโซมที่เตรียมได้แตกออกมานำสารละลายที่ได้ไปเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่ต้องการ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเปปไทด์และโปรตีนด้วย High performance liquid chromatography

1.2 ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาต่างๆโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด Franz โดยใช้ตัวยา meloxicam ใส่ในด้านฝั่งให้ (donor phase) และ Phosphate buffer 7.4 ใส่ในด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนังกึ่งอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยสารละลายในฝั่งรับจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วยน้ำปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ซึมผ่านโดยใช้ HPLC

1.3 ตรวจสอบกลไกการซึมผ่านผิวหนังของไลโปโซมโดยใช้ Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC)

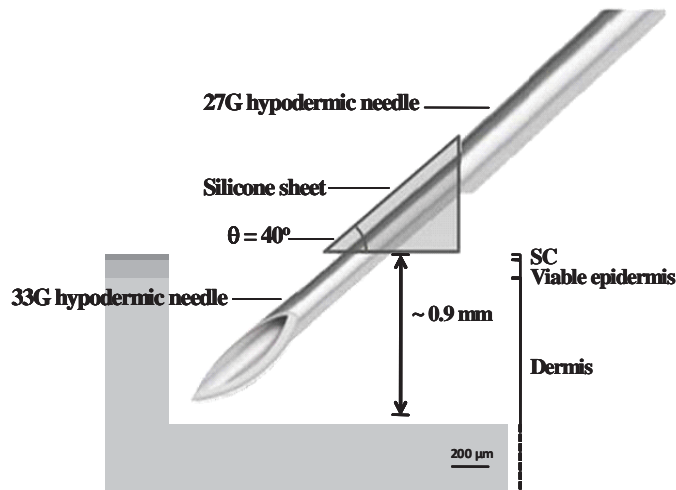
ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับของไลโปโซมที่ใช้ในการทดสอบ

Name (molar ratio)	Composition (%W/V)						
	MX	PC	Chol	NaO	NaChol	DCP	PBS pH 7.4
MX/PC (2:10)	0.07	0.77	-	-	-	-	100 ml
MX/PC/Chol (2:10:2)	0.07	0.77	0.07	-	-	-	100 ml
MX/PC/NaO (2:10:2)	0.07	0.77	-	0.06	-	-	100 ml
MX/PC/NaO/Chol (2:10:2:2)	0.07	0.77	0.07	0.06	-	-	100 ml
MX/PC/NaChol (2:10:2)	0.07	0.77	-	-	0.08	-	100 ml
MX/PC/NaChol/Chol (2:10:2:2)	0.07	0.77	0.07	-	0.08	-	100 ml
MX/PC/DCP (2:10:2)	0.07	0.77	-	-	-	0.11	100 ml
MX/PC/DCP/Chol (2:10:2:2)	0.07	0.77	0.07	-	-	0.11	100 ml

## 2. การศึกษาความสามารถของไมโครนีดเดิลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านผิวหนังของยาโมเลกุลขนาดใหญ่

### 2.1. การเตรียมไมโครนีดเดิล

เตรียมโดยใช้ hypodermic needle เบอร์ 30 ต่อกับเข็มขนาดเล็กและใช้ silicone sheet เป็นตัวกำหนดความยาวเข็ม (รูปที่ 2) และให้เข็มแทงเข้าสู่ผิวหนังเป็นมุม 40 องศาเพื่อให้ปลายเข็มเข้าสู่ผิวหนังทั้งหมดไม่ร้าวออกนอกผิวหนัง



รูปที่ 2 แสดงการเตรียม hollow microneedles

### 2.2 การเตรียมผิวหนังหนู

ผิวหนังได้จากหนูสายพันธุ์ Wistar rat ตัดผิวหนังและทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือ ก่อนใช้ตัดผิวหนังให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรและนำไปซึ่งบนอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่าน

### 2.3 ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา

การศึกษาทำโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด Franz โดยใช้ตัวยา Fluorescein isothiocyanate dextran-4 ใส่ในด้านฝั่งให้ (donor phase) โดยฉีดเข้าสู่ผิวหนังในปริมาตร 5, 10, 20  $\mu$ l ของ 1 mM FD-4 และ Phosphate buffer 7.4 ใส่ในด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนังถูกขึงอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยสารละลายในฝั่งรับจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วยน้ำปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ซึมผ่านโดยใช้ Fluorescence spectroscopy Ex 495 nm, Em 415 nm

นอกจากปริมาตรแล้ว จำนวนครั้งในการฉีดให้ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรคือ 10 ไมโครลิตร 1 ครั้ง 5 ไมโครลิตร 2 ครั้ง และ 2.5 ไมโครลิตร 4 ครั้ง และผลของรูปแบบของระบบนำส่งยา คือ สารละลาย ไลโปโซม และอิมัลชันในการนำส่งตัวยายังได้มีการศึกษาในการทดลองนี้ด้วย

### 2.4 การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูลและคำนวณหาตัวแปรต่างๆจากปริมาณยาที่ซึมผ่าน

- Flux หรือ Skin permeation rate สำหรับการซึมผ่าน
- Enhancement ratio โดยเปรียบเทียบ Flux หรือ Skin permeation rate ที่มีการเร่งการซึมผ่านและไม่มีการใช้วิธีเร่งการซึมผ่าน สำหรับการซึมผ่านกรณีสารมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันและวิธีการเพิ่มการซึมผ่านต่างๆกัน

2.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของการซึมผ่านผิวหนัง โดยการใช้สมการ Higuchi, zero order และ Peppas Model ในการศึกษา

### 2.6 การศึกษาคุณสมบัติของผิวหนังที่มีการใช้ไมโครนิดเดิ้ล

ถ่ายภาพผิวหนังที่มีการใช้ไมโครนิดเดิ้ลและ/หรือสารเร่งการซึมผ่านโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

## 3. การศึกษาความสามารถของไมโครนิดเดิ้ลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีน

ในการศึกษาดังกล่าวจะเลือกศึกษาผลของไมโครนิดเดิ้ลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านของ เปปไทด์และโปรตีน 3 ชนิดคือ peptide 8 amino acid (KKKKKKKK), superoxide dismutase และ bovine serum albumin เป็นตัวแทนสารและยาเปปไทด์และโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่างๆกัน และเลือกใช้สารเร่งการซึมผ่าน 3 ชนิดคือ ethanol, ethanol + menthol และ ethanol + menthol + limonene เป็นตัวแทนของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง ในการศึกษานี้พิจารณาผลการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนผ่านผิวหนังมนุษย์โดยศึกษาจากผลของปัจจัยต่างๆ 4 ปัจจัยคือ 1. กรณีไม่ได้มีการใช้ไมโครนิดเดิ้ลหรือสารเร่งการซึมผ่าน 2. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนิดเดิ้ลเพียงอย่างเดียว 3. กรณีใช้สารเร่งการซึมผ่านเพียงอย่างเดียว และ 4. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนิดเดิ้ลเพียงร่วมกับการให้สาร

เร่งการซึมผ่านร่วมกัน โดยทุกกรณีจะทำการศึกษาผลของระบบนำส่งไลโปโซมต่อความคงตัวและการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนคือที่ใช้และไม่ใช้ไลโปโซมที่บรรจุเปปไทด์หรือโปรตีนเป็นระบบนำส่ง

### 3.1. การเตรียมไมโครนีดเดิล

เตรียมโดยใช้ hypodermic needle เบอร์ 30 ต่อกับเข็มขนาดเล็กและใช้ silicone sheet เป็นตัวกำหนดความยาวเข็ม (รูปที่ 2) และให้เข็มแทงเข้าสู่ผิวหนังเป็นมุม 40 องศาเพื่อให้ปลายเข็มเข้าสู่ผิวหนังทั้งหมดไม่ร้าวออกนอกผิวหนัง

### 3.2 การเตรียมผิวหนังหนู

ผิวหนังได้จากหนูสายพันธุ์ Wistar rat ตัดผิวหนังและทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือ ก่อนใช้ตัดผิวหนังให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรและนำไปซึ่งบนอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่าน

3.3 ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีนขนาดโมเลกุลต่างๆโดยวิธีในหลอดทดลอง

การศึกษาทำโดยโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด side by side โดยใช้ FD โดยใส่ในด้านฝั่งให้ (donor phase) และ phosphate buffer pH 7.4 ด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนังมนุษย์ถูกขึงอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยศึกษาปัจจัยต่างๆข้างต้นคือ 1.กรณีไม่ได้มีการใช้ไมโครนีดเดิลหรือสารเร่งการซึมผ่าน 2. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนีดเดิลเพียงอย่างเดียว 3. กรณีใช้สารเร่งการซึมผ่านเพียงอย่างเดียวและ 4. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนีดเดิลเพียงร่วมกับการให้สารเร่งการซึมผ่านร่วมกัน โดยทุกกรณีจะทำการศึกษาผลของระบบนำส่งคือที่ใช้และไม่ใช้ไลโปโซมที่บรรจุเปปไทด์หรือโปรตีนเป็นระบบนำส่ง โดยสารละลายในสองฝั่งจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสุมตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วย phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ซึมผ่านโดยใช้ High performance liquid chromatography

3.4 การศึกษาคุณสมบัติของผิวหนังที่มีการใช้ไมโครนีดเดิลและ/หรือสารเร่งการซึมผ่าน  
ถ่ายภาพผิวหนังที่มีการใช้ไมโครนีดเดิลและ/หรือสารเร่งการซึมผ่านโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

3.5 การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูลและคำนวณหาตัวแปรต่างๆจากปริมาณยาที่ซึมผ่าน  
- Flux หรือ Skin permeation rate สำหรับการซึมผ่าน  
- Enhancement ratio โดยเปรียบเทียบ Flux หรือ Skin permeation rate ที่มีการเร่งการซึมผ่านและไม่มีการใช้วิธีเร่งการซึมผ่าน สำหรับการซึมผ่านกรณีสารมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันและวิธีการเพิ่มการซึมผ่านต่างๆกัน

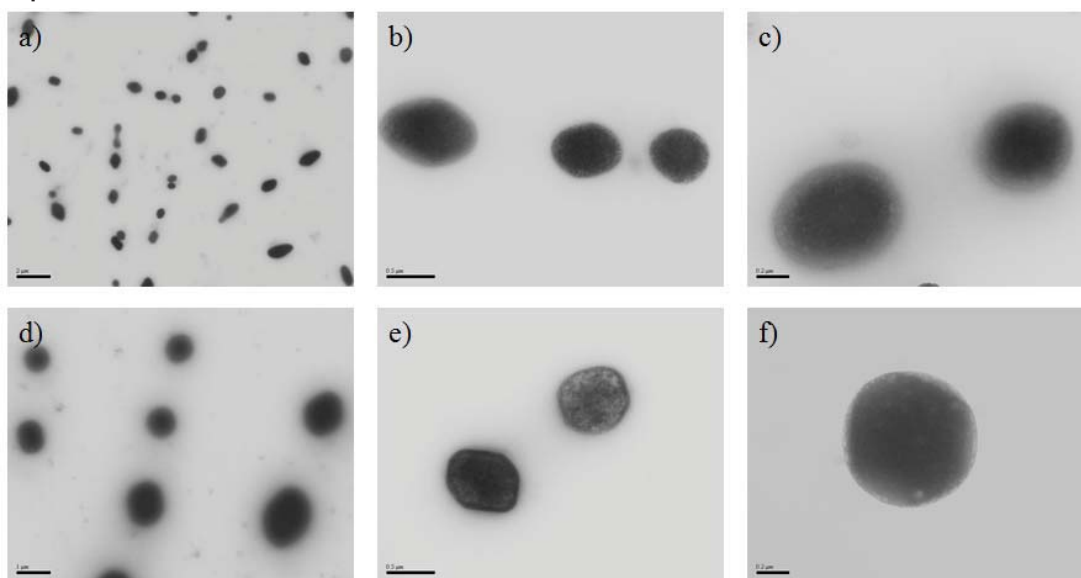


## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 1. การเตรียมและประเมินคุณลักษณะของยาในรูปแบบไลโปโซม

ในการเตรียมไลโปโซมเพื่อใช้ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังจะใช้ตัวยาคำคัญ คือ มีลอกซีแคม ซึ่งเป็นยาในกลุ่มยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ ที่มีการละลายต่ำทำการศึกษาคุณลักษณะของตำรับที่ได้และศึกษาสูตรตำรับที่มีการซึมผ่านดีนำไปประยุกต์ใช้ในการตั้งตำรับสำหรับบรรจุยาในกลุ่มเปปไทด์ โปรตีนเพื่อศึกษาในการทดลองสำหรับไมโครนิดเจิ้ลต่อไป

#### คุณลักษณะของไลโปโซมที่เตรียมได้



รูปที่ 3 Transmission electron microscopy ของมีลอกซีแคมที่บรรจุในไลโปโซม (a) MX loaded in liposomes (PC) (5,000X), (b) MX loaded in liposomes (PC) (30,000X), (c) MX loaded in liposomes (PC) (50,000X), (d) MX loaded in transfersomes (PC/NaChol) (10,000X), (e) MX loaded in transfersomes (PC/NaChol) (30,000X) และ (f) MX loaded in transfersomes (PC/NaChol) (50,000X).

ขนาดไลโปโซมที่เตรียมได้มีรูปร่างกลม ลักษณะผนังชั้นเดียว (unilamellar vesicle) (รูปที่ 3) และมีขนาดระหว่าง 89-137 นาโนเมตร การกระจายขนาดที่แคบ (ตารางที่ 2) การเติมโคเลสเตอรอลทำให้ขนาดของไลโปโซมลดลงเนื่องจากความสามารถของโคเลสเตอรอลที่จะทำให้ bilayer ของ ไลโปโซมจับกันแข็งแรงมากขึ้น ประจุของไลโปโซมที่เตรียมได้มีประจุลบจากผลรวมประจุที่เป็นองค์ประกอบของไลโปโซมในตำรับ ซึ่งมีรายงานว่าไลโปโซมที่มีประจุลบสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดีกว่าไลโปโซมที่มีประจุบวก

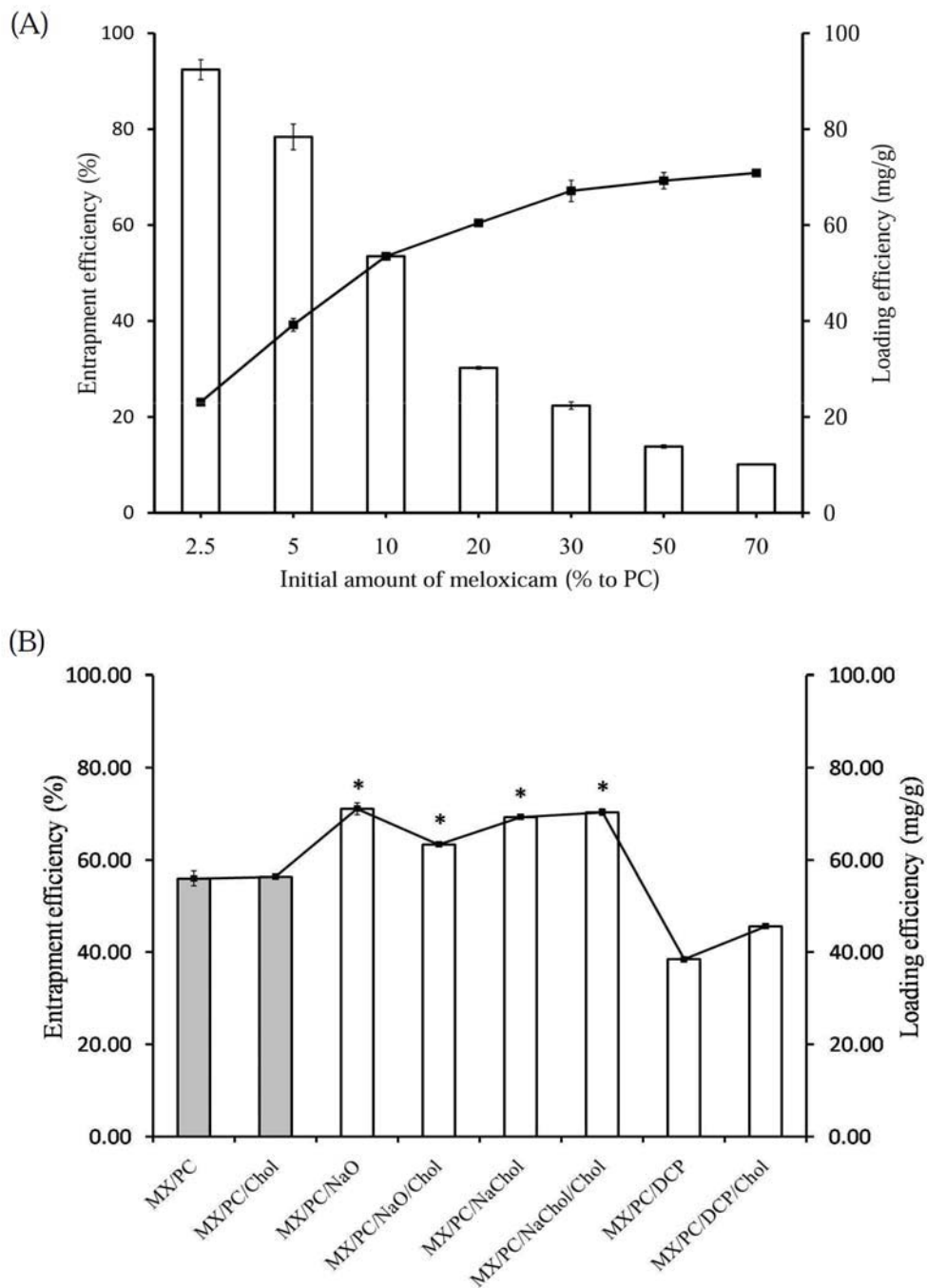


ตารางที่ 2 ขนาดและความเป็นประจุของไลโปโซมที่เตรียมได้

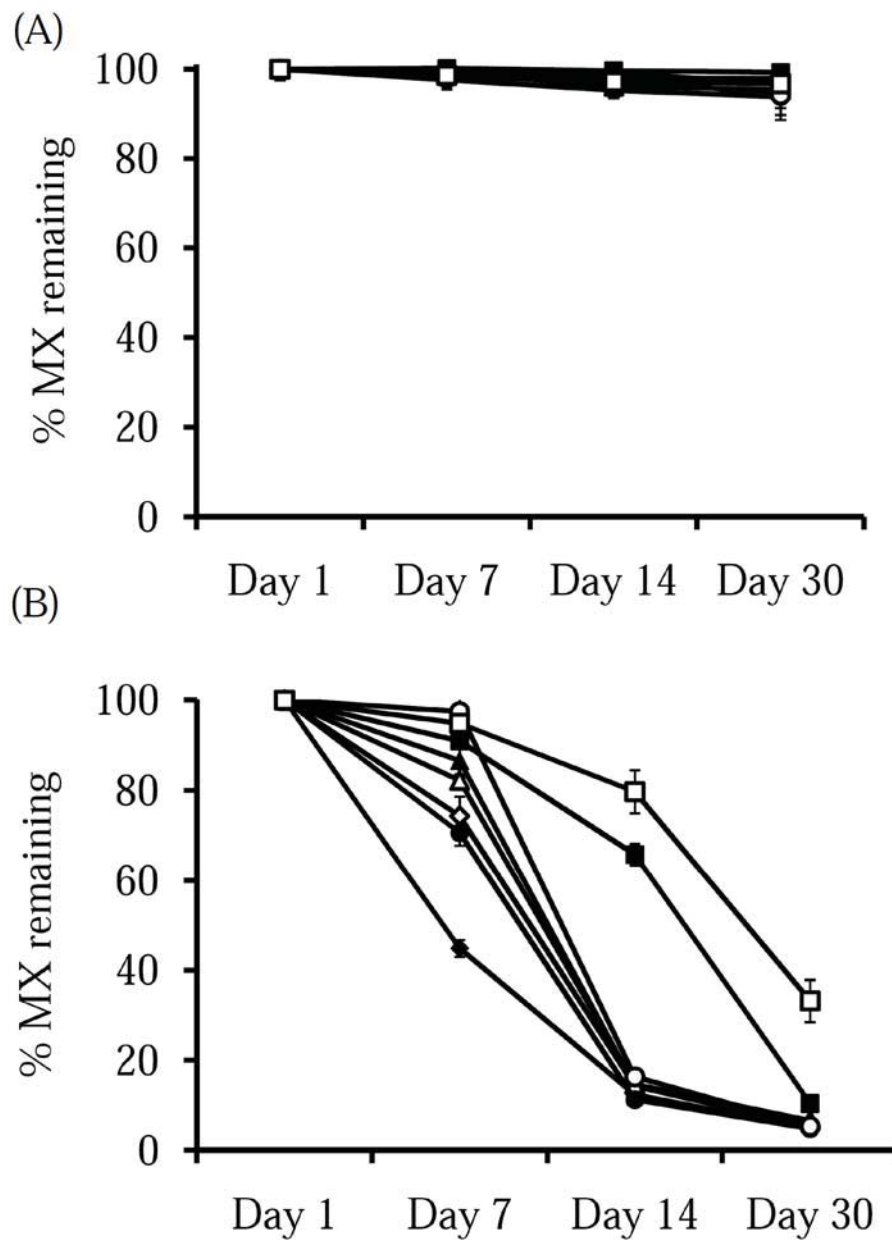
Name	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
MX/H <sub>2</sub> O	2411.6 ± 84.2	-19.3 ± 0.7
MX/PC	107.0 ± 5.0	-35.0 ± 0.5
MX/PC/Chol	100.3 ± 0.6	-23.5 ± 0.2
MX/PC/NaO	107.4 ± 0.5	-43.4 ± 0.1
MX/PC/NaO/Chol	100.5 ± 0.6	-23.1 ± 0.0
MX/PC/NaChol	93.0 ± 1.0	-32.7 ± 0.7
MX/PC/NaChol/Chol	88.6 ± 0.7	-28.9 ± 0.5
MX/PC/DCP	137.2 ± 6.1	-35.2 ± 0.6
MX/PC/DCP/Chol	126.5 ± 1.6	-29.3 ± 0.5

ผลการทดลอง entrapment efficiency และ loading efficiency แสดงในรูปที่ 4 ในตำรับที่บรรจุยา 2.5 % จะมีค่า entrapment efficiency สูงสุดแต่ค่า loading efficiency ต่ำสุด ขณะที่ในตำรับที่บรรจุยา 70 % จะมีค่า entrapment efficiency ต่ำสุดแต่ค่า loading efficiency สูงสุดอย่างไรก็ตามการเลือกบรรจุยาที่เหมาะสมควรอยู่ที่ประมาณ 10 % ค่า entrapment efficiency และ loading efficiency ในตำรับที่มีสารลดแรงตึงผิวบรรจุอยู่จะมีค่าสูงกว่าในตำรับที่ไม่มีแรงตึงผิวบรรจุอยู่เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวจะไปแทรกอยู่ในไลโปโซมและเพิ่มการกักเก็บตัวยาไว้ในไลโปโซม เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวที่ทำการทดลองพบว่า sodium oleate (NaO) ให้ค่า entrapment efficiency และ loading efficiency สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ sodium cholate (Na Chol) และ dicetylphosphate (DCP) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยึดเกาะกับยาที่แตกต่างกันของสารลดแรงตึงผิว

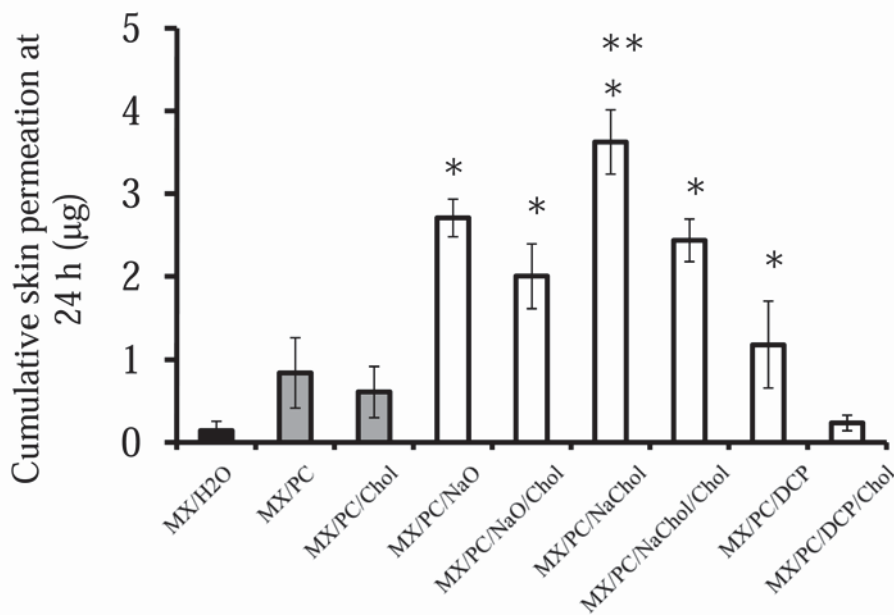
ในการศึกษาความคงตัวของไลโปโซมของตำรับที่เตรียมได้เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 30 วัน (รูปที่ 5) พบว่า ความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะมีความคงตัวทั้งทางกายภาพ และ เคมีดีที่สุด ดังนั้นจึงควรเก็บตำรับที่เตรียมได้ในตู้เย็น



รูปที่ 4 (A) ผลของปริมาณยา (2.5, 5, 10, 20, 30, 50, and 70%) ที่บรรจุในไลโปโซมต่อ entrapment efficiency (แท่งสีขาว) และ loading efficiency (เส้นดำ) ของตัวยาที่บรรจุในไลโปโซม. และ (B) ผลของยาที่บรรจุในตำรับต่างๆต่อ entrapment efficiency (แท่งสีขาว) และ loading efficiency (เส้นดำ) ของตัวยาที่บรรจุในไลโปโซม. (■) กลุ่มควบคุม (■) ไลโปโซม และ (□) ทรานสเฟอริโซม (n=6)



รูปที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์ของยามีลือกซีแคมที่ยังคงอยู่ในตำรับในแต่ละสูตรตำรับ (◆) PC, (◇) PC/Chol, (▲) PC/NaO, (△) PC/NaO/Chol, (●)PC/NaChol, (○)PC/NaChol/Chol, (■) PC/DCP, and (□) PC/DCP/Chol หลังจากเก็บที่ (A) 4 องศาเซลเซียส และ (B) 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

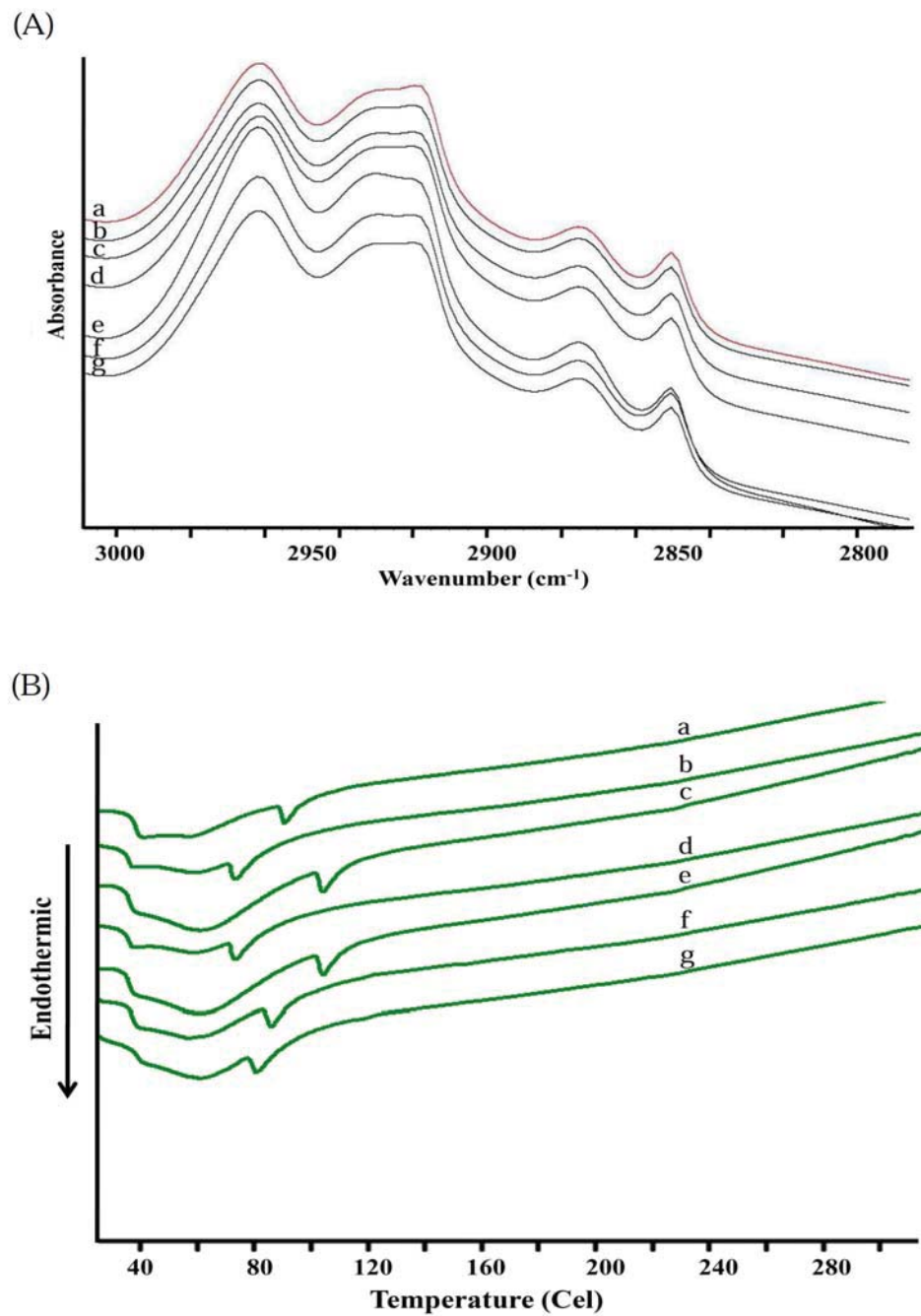


รูปที่ 6 แสดงปริมาณยาที่ซึมผ่านผิวหนังที่เวลา 24 ชั่วโมงของไลโปโซมสูตรตำรับต่างๆ (■)กลุ่มควบคุมยาแขวนตะกอน (■) ไลโปโซม (□) ไลโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิวสูตรต่างๆ

\* ( $P < 0.05$ ) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมยาแขวนตะกอน

\*\* ( $P < 0.05$ ) เปรียบเทียบกับไลโปโซม

จากการเปรียบเทียบความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังของไลโปโซมในสูตรตำรับต่างๆ โดยพิจารณาจากค่าอัตราเร็วในการซึมผ่านของยา (flux) และปริมาณยาที่ซึมผ่านผิวหนังที่ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 6) พบว่าในตำรับที่เป็นกลุ่มควบคุมคือ ยาแขวนตะกอนมีการซึมผ่านผิวหนังในปริมาณที่น้อยที่สุด รองลงมาคือ ไลโปโซมที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว และสูงสุดคือ ไลโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมีคุณสมบัติเป็นทั้งสารช่วยเพิ่มการละลายและเพิ่มการซึมผ่านของตัวยา ผ่านผิวหนัง สารลดแรงตึงผิวมีความสามารถในการทำให้ชั้น stratum corneum ของผิวหนังเกิดการบวมโดยเกิดปฏิกิริยากับชั้นเคราตินในส่วนของ intercellular และช่วยทำให้ชั้นไขมันใน stratum corneum มีการ fluidize เป็นผลทำให้เกิดช่องทางที่ยาจะซึมผ่านเข้าไปได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามกลไกการซึมผ่านผิวหนังของไลโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิวบรรจุอยู่สามารถอธิบายจากผลของ DSC และ FTIR จากรูปที่ 7 ต่อไป เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการซึมผ่านของไลโปโซมในกลุ่มที่มีสารลดแรงตึงผิวพบว่า ในตำรับที่มี sodium cholate (Na Chol, C18) > sodium oleate (NaO, C24) > dicetylphosphate (DCP, C32) สำหรับตำรับที่มีการผสมคลอเรสเตอรอลจะทำให้การซึมผ่านของตัวยาลดลง สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่ใช้นั้นพบว่า สารลดแรงตึงผิวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากจะมีการซึมผ่านผิวหนังที่น้อยกว่า และอีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดเนื่องจากขนาดของไลโปโซมที่มีคาร์บอนอะตอมมากจะมีขนาดใหญ่กว่าไลโปโซมที่มีคาร์บอนอะตอมของสารลดแรงตึงผิวที่บรรจุอยู่



รูปที่ 7 (A) FT-IR spectra ของผิวหนังหลังจากการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง  
 (B) DSC thermogram ของผิวหนังหลังจากการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ;  
 (a) Untreated skin, (b) PC/NaO, (c) PC/NaO/Chol, (d) PC/NaChol, (e) PC/NaChol/Chol, (f)  
 PC/DCP, and (g) PC/DCP/Chol

จากการศึกษาคุณลักษณะของผิวหนังหลังจากที่ผ่านการผ่านการซึมผ่านของไลโปโซมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้เครื่องมือ FTIR และ DSC (รูปที่ 7) พบว่า ในกรณี FTIR รูปที่ 7A ในกรณีการใส่สารลดแรงตึงผิวจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ C-H (CH<sub>2</sub>) asymmetric stretching peak ที่ 2920 cm<sup>-1</sup> และ C-H (CH<sub>2</sub>) symmetric stretching peak ที่ 2850 cm<sup>-1</sup> ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิด fluidity ของชั้นไขมันในชั้น stratum corneum ของผิวหนัง แสดงให้เห็นว่าในตำรับไลโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิวบรรจุอยู่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในชั้นไขมันของผิวหนังได้

สำหรับผลของ DSC ในรูปที่ 7B แสดงให้เห็นว่าชั้น stratum corneum แสดงคุณสมบัติเป็น solid gel ที่อุณหภูมิ 244 องศาเซลเซียส การใส่ไลโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิวลงไปในผิวหนังจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ solid gel ในกรณี Na Chol เป็น 198 องศาเซลเซียส NaO 207 องศาเซลเซียส และ DCP 218 องศาเซลเซียสตามลำดับ และการมีคอเลสเทอรอลจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ solid gel temperature ไปอีกเล็กน้อย การเปลี่ยนแปลง transition temperature ไปยังอุณหภูมิที่น้อยลงแสดงให้เห็นถึงการทำให้เกิด fluidity ขึ้นของสารลดแรงตึงผิวของไลโปโซม

ผลจากการทดลองหาสูตรตำรับของไลโปโซมเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อพบว่า ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใส่ลงไปในไลโปโซมมีผลต่อความสามารถในการกักเก็บยาเข้าสู่ไลโปโซมและการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาซึ่งในการทดลองต่อไปจะใช้ตำรับไลโปโซมที่บรรจุ sodium cholate เพื่อศึกษาต่อไป

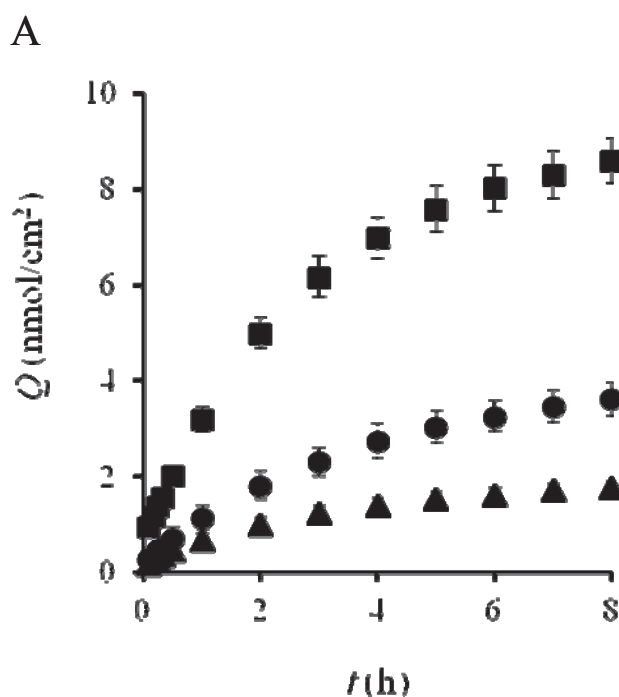
## 2. การศึกษาความสามารถของไมโครนิดเดิ้ลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านผิวหนังของยาโมเลกุลขนาดใหญ่

### 2.1 การเตรียมไมโครนิดเดิ้ลรูปแบบรูกลวง (hollow type)

ในการวิจัยนี้สามารถเตรียมไมโครนิดเดิ้ลชนิดรูกลวงได้ โดยใช้ hypodermic needle เบอร์ 30 ต่อกับเข็มขนาดเล็กและใช้ silicone sheet เป็นตัวกำหนดความยาวเข็ม และให้เข็มแทงเข้าสู่ผิวหนังเป็นมุม 40 องศาเพื่อให้ปลายเข็มเข้าสู่ผิวหนังทั้งหมดไม่ร้าวออกนอกผิวหนังในการทดลองการทดสอบนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้ Fluorescein isothiocyanate dextran-4 (FD-4) เป็นยาต้นแบบ และศึกษาความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังของ FD-4 โดยศึกษาปัจจัยของปริมาณที่ฉีดเข้าผิวหนัง จำนวนครั้งที่ฉีดเข้าผิวหนัง และ ผลของรูปแบบการนำส่งยาต่อการซึมผ่านผิวหนัง

### 2.2 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีต่อการซึมผ่านผิวหนังของยาขนาดโมเลกุลใหญ่โดยใช้ไมโครนิดเดิ้ลรูปแบบรูกลวง

#### 2.2.1 ผลของปริมาณสารที่ฉีดเข้าสู่ผิวหนังโดยไมโครนิดเดิ้ล



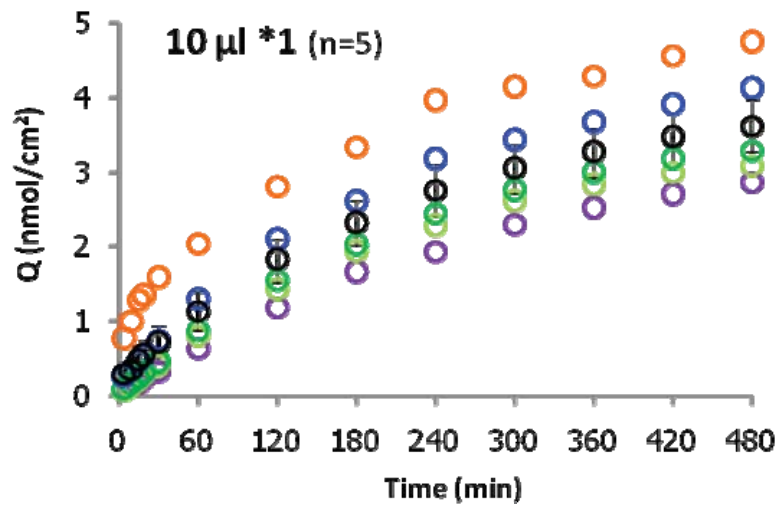
รูปที่ 8 แสดงผลของปริมาณที่ฉีด FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา

(■) 20 µl (●) 10 µl และ (▲) 5 µl

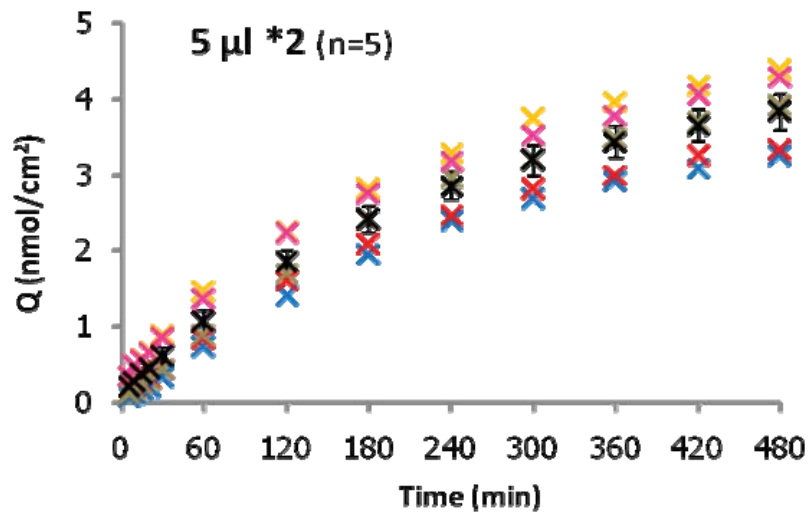
จากรูปที่ 8 เมื่อเขียนกราฟปริมาณยา FD-4 ที่ซึมผ่านผิวหนังกับเวลา ตัวยาสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้โดยปริมาณที่ฉีดเข้าสู่ผิวหนังในปริมาณที่สูงสูงจะสามารถซึมผ่านได้มากกว่าการฉีดเข้าสู่ผิวหนังปริมาณน้อยจากกราฟพบว่าปริมาณยาที่ฉีด 20 µl > 10 µl > 5 µl ตามลำดับ

### 2.2.2 ผลของจำนวนการฉีดสารเข้าสู่ผิวหนังโดยไมโครนิดเดิ้ล

ในการทดลองนี้จะศึกษาผลของการฉีดยาในปริมาณที่เท่ากันคือ 10 ไมโครลิตร แต่แบ่งการให้ไม่เท่ากันต่อผลการซึมผ่านผิวหนังของยา FD-4

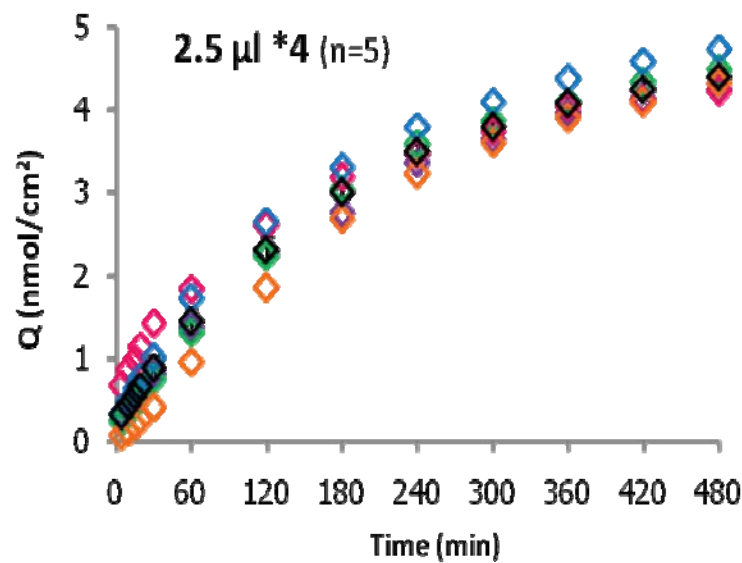


รูปที่ 9 แสดงผลของการฉีด 10 ไมโครลิตร 1 ครั้ง ของ FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา



รูปที่ 10 แสดงผลของการฉีด 5 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ของ FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา





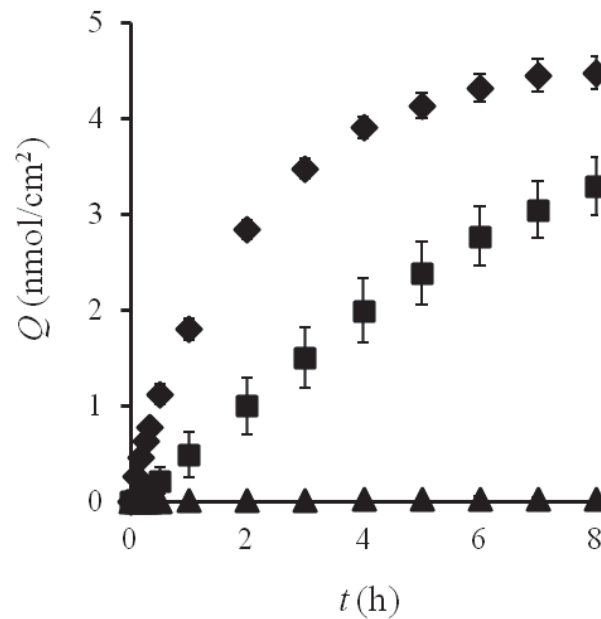
รูปที่ 11 แสดงผลของการฉีด 2.5 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ของ FD-4 เข้าผิวหนังต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของ FD-4 ที่ผ่านผิวหนังที่ 8 h หลังฉีดยาด้วยไมโครนิดเดิลชนิดรูกลวง

Injection volume (µL)	%	Number of injections <sup>a</sup>	%
5	80.2 ± 3.4	1 (10 µL)	81.2 ± 1.6
10	81.2 ± 1.6	2 (each 5 µL)	82.3 ± 1.0
20	84.6 ± 3.4	4 (each 2.5 µL)	85.2 ± 1.2*

จากผลการศึกษาพบว่าในรูปที่ 9-12 และตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าจำนวนครั้งของการฉีดมีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อการซึมผ่านของยาผ่านของ sodium fluorescein โดยตัวยาจะผ่านออกได้ประมาณร้อยละ 80 ที่เวลา 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามจากการทดลองมีแนวโน้มพบว่าการฉีดหลายครั้งเพื่อให้มีปริมาตรเท่ากับการฉีดครั้งเดียวมีโอกาที่ยาจะซึมผ่านผิวหนังการฉีดจำนวนน้อยครั้งทั้งนี้สาเหตุอาจเกิดจากการที่พื้นผิวสัมผัสยาของผิวหนังกับบริเวณที่ยาจะซึมผ่านมีมากกว่า

### 2.2.3 ผลของรูปแบบนำส่งยาสู่วิวหนังต่อการซึมผ่านยาโดยไมโครนิดเดิ้ล



รูปที่ 12 การซึมผ่านของระบบนำส่งยาต่างๆคือ สารละลาย (◆) อิมัลชัน (■) และไลโปโซม (▲) ต่อการซึมผ่านผิวหนังของ sodium fluorescein โดยHollow microneedle

จากผลการศึกษาพบว่ารูปแบบยามีผลต่อการนำส่งยาโดยไมโครนิดเดิ้ลโดยพบว่า สารละลาย (90%) จะให้ปริมาณยาที่ซึมผ่านมากกว่าอิมัลชัน (70%) และไลโปโซม (3.6%) ตามลำดับ สาเหตุอาจเนื่องมาจากการกักกักยาในรูปแบบของไลโปโซมเป็นแบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled release) มากกว่าอิมัลชันและสารละลายตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ไมโครนิดเดิ้ล ชนิด hollow มีโอกาสที่จะนำมาใช้ในการนำส่งยาที่มีโมเลกุลใหญ่ได้ โดยสูตรตำรับและขนาดโมเลกุล มีผลต่อการซึมผ่านของตัวยาผ่านผิวหนัง

### 2.3 การศึกษาจลนศาสตร์ของการซึมผ่านผิวหนังของ FD-4 โดยใช้ไมโครนิดเดิ้ลชนิดรูกลวง

การศึกษาจลนศาสตร์การซึมผ่านผิวหนังทำโดยใช้สมการ Peppas (Eq. 1)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1)$$

$M_t$  = the amount of drug released at time  $t$

$M_\infty$  = the amount of drug released at infinite time.

$M_t/M_\infty$  = the fractional drug release

$t$  = the release time

$k$  = a kinetic constant incorporating structural and geometric characteristics of the controlled release device

$n$  = an exponent which characterizes the mechanism of diffusional release

จากสมการจะเป็น Fickian diffusion ถ้า  $n \leq 0.5$ ,  
 anomalous (non-Fickian) transport ถ้า  $n > 0.5 - < 1.0$ , case II transport  
 zero order (time-independent release) for  $n = 1.0$ , and super-case-II transport for  $n > 1.0$ .  
 การปลดปล่อยตัวยากรณีเป็น Higuchi model จะเป็นไปตามสมการดังนี้

$$Q = Kt^{1/2} \quad (2)$$

$Q$  = the cumulative amount of FD-4 released from the FD-4 loaded skin into receiver solution per unit surface area ( $\text{nmol}/\text{cm}^2$ )

$K$  = the kinetic constant indicative of the release rate ( $\text{nmol}/\text{cm}^2 \text{h}^{1/2}$ ).

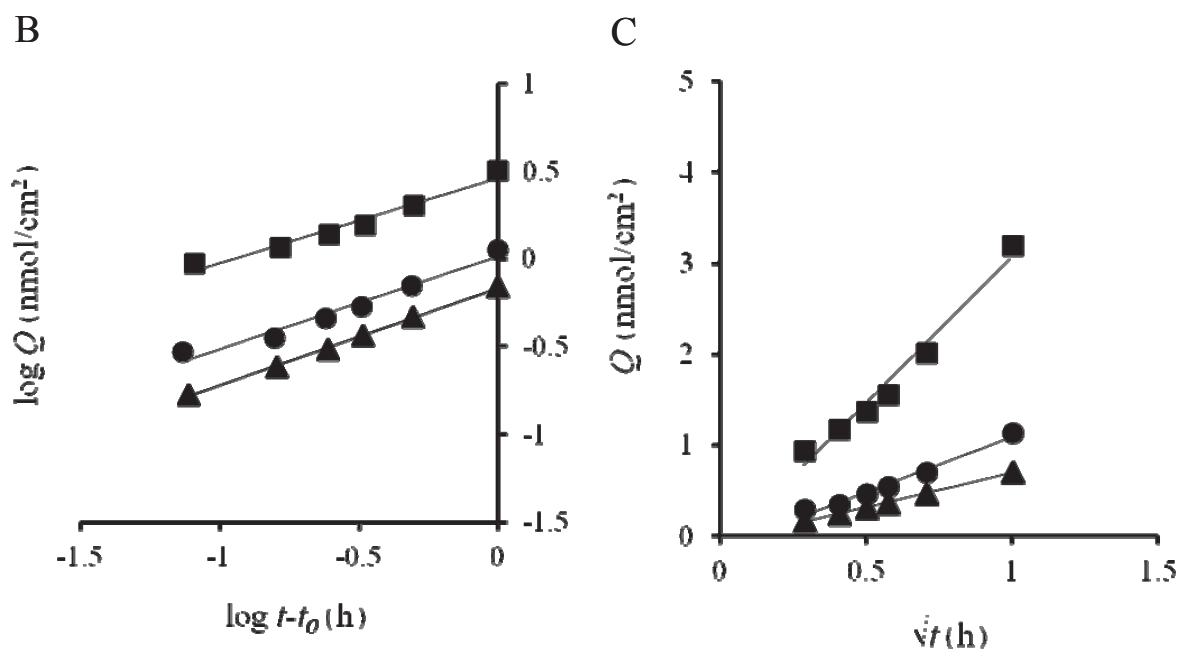
diffusion coefficient of FD-4 in skin by employing a hollow microneedle,  $D_{\text{Skin}}$  ( $\text{cm}^2/\text{h}$ ) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3

$$Q = 2C_0 \sqrt{\frac{D_{\text{Skin}} t}{\pi}} \quad (3)$$

$C_0$  = the initial concentration of FD-4 in skin after direct injection ( $\text{nmol}/\text{mL}$ ).

ตารางที่ 4 ค่าคงที่การปลดปล่อยตัวยา FD-4 ที่ผ่านผิวหนังที่ 8 h หลังฉีดยาด้วยไมโครนีดเดิลชนิดรูกลวง

Peppas model			
$M_t/M_\infty = kt^n$			
	Exponent ( $n$ )	Kinetic constant ( $k$ )	$r^2$
Injection volume ( $\mu\text{L}$ )			
5	0.556	0.689	0.999
10	0.528	1.040	0.967
20	0.485	2.895	0.965
Number of injections			
1 (10 $\mu\text{L}$ )	0.528	1.040	0.967
2 (each 5 $\mu\text{L}$ )	0.564	0.935	0.965
4 (each 2.5 $\mu\text{L}$ )	0.564	1.345	0.983



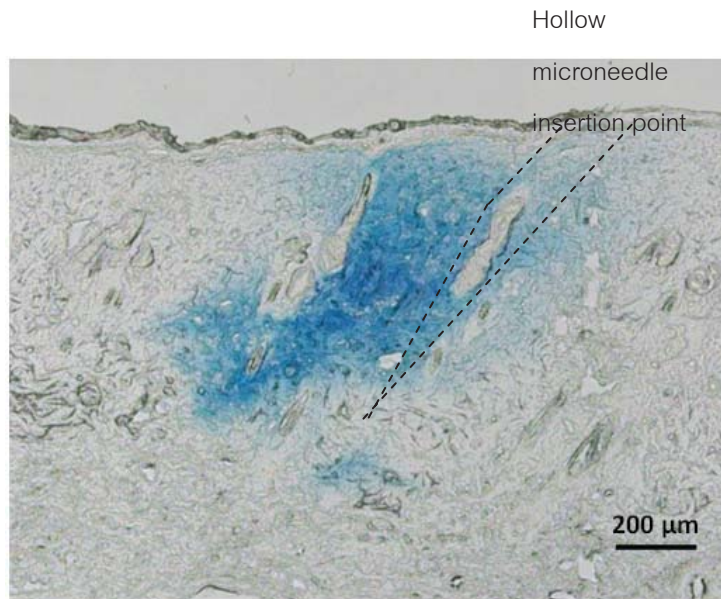
รูปที่ 13 Higuchi plot ของการฉีด FD-4 ในจำนวนครั้งที่แตกต่างกันต่อการซึมผ่านตัวยา

Solid line represents calculated value. The values in Fig. 2B and 2C are represented by the following equations, respectively: ▲;  $\log Q = 0.56 \times \log t-t_0 - 0.16$  ( $r^2 = 0.999$ ) and  $Q = 0.75 \times \sqrt{t} - 0.059$  ( $r^2 = 0.998$ ), ●;  $\log Q = 0.53 \times \log t-t_0 + 0.017$  ( $r^2 = 0.967$ ) and  $Q = 1.2 \times \sqrt{t} - 0.12$  ( $r^2 = 0.979$ ), ■;  $\log Q = 0.48 \times \log t-t_0 + 0.46$  ( $r^2 = 0.965$ ) and  $Q = 3.2 \times \sqrt{t} - 0.15$  ( $r^2 = 0.974$ ).

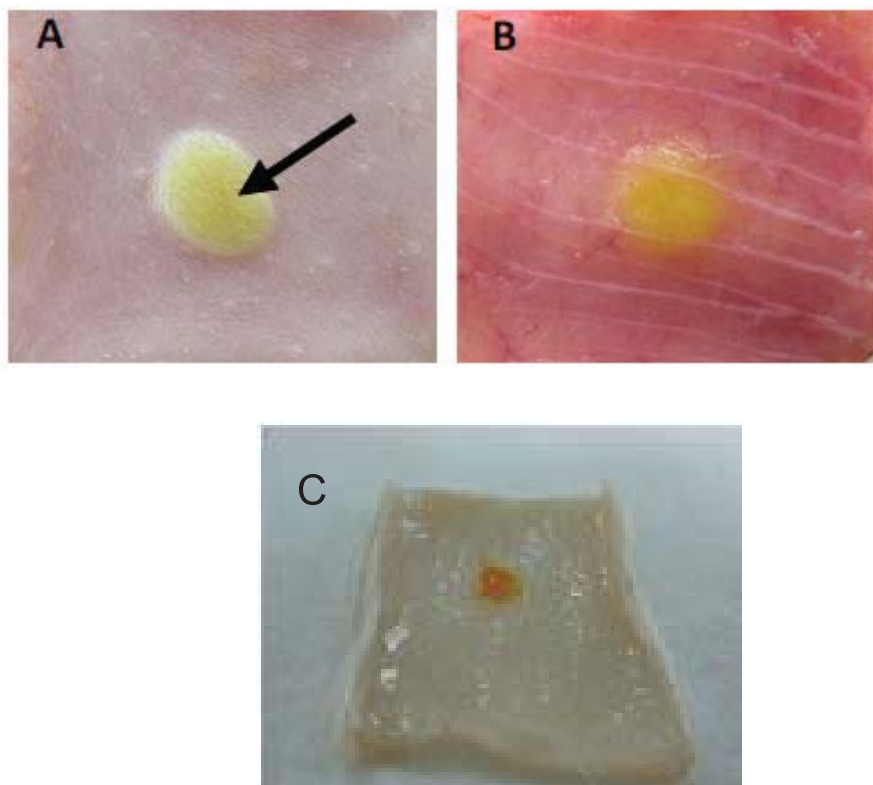
จากรูปที่ 13 และตารางที่ 2 ในการศึกษาจลนศาสตร์ของการปลดปล่อยตัวยาพบว่า การปลดปล่อยตัวยาจากผิวหนังเป็นแบบ Higuchi คือมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณการปลดปล่อยตัวยาและรากที่สองของเวลาที่ปลดปล่อยเป็นเส้นตรงและมีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.97 และมีค่า exponent (n) ใกล้เคียงกับ 0.5 จากตารางที่ 2 สามารถหาค่าคงที่ของการปลดปล่อยยาของตำรับต่างๆได้ดังนี้ Injection volume 20  $\mu$ l (2.9) > 10  $\mu$ l (1.0) > 5  $\mu$ l (0.7) และตำรับ ฉีด 2.5  $\mu$ l 4 ครั้ง (1.3) > 10  $\mu$ l 1 ครั้ง (1.0) > 5  $\mu$ l 2 ครั้ง (0.9)

#### 2.4 Histology ของการฉีดยา FD -4 โดยใช้ไมโครนิดเดิ้ลชนิดรูกลวงเข้าสู่ผิวหนังหนู

ภาพจากการถ่ายรูปเนื้อเยื่อของผิวหนังหนูที่ฉีดยา FD -4 โดยใช้ไมโครนิดเดิ้ลชนิดรูกลวงในรูปที่ 14 พบว่าไมโครนิดเดิ้ลสามารถนำส่งยา FD-4 เข้าสู่ผิวหนังเป็นรอยของเข็ม และในรูปที่ 15 ในเนื้อเยื่อผิวหนังเมื่อพิจารณาจากทั้งด้านหน้าทั้งด้านหลัง และผิวหนังทั้งชั้นพบว่า ตัวยา FD-4 ถูกฉีดให้อยู่ในบริเวณไม่เกิดการรั่วออกมาก่อนการศึกษาการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ



รูปที่ 14 แสดงภาพ Histology ของการฉีด Fluorescein isothiocyanate dextran-4 ในผิวหนังหนู



รูปที่ 15 แสดงภาพผิวหนังภายหลังการฉีด Fluorescein isothiocyanate dextran-4  
ใน A) ถ่ายจากด้านหน้า B) ถ่ายจากด้านข้าง C) ถ่ายทั้งชั้นผิวหนัง

จากผลการศึกษาในตอนที 2 พบว่าสามารถนำส่งยาที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น Flurescein isothiocynate-dextran ได้โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวง โดยการฉีดเข้าสู่ผิวหนังโดยทำมุม 40 องศากับผิวหนัง ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพการซึมผ่านยาเข้าสู่ผิวหนังเนื่องจากหลบเลี่ยงชั้น stratum corneum ในชั้นหนังกำพร้าซึ่งเป็นชั้นกีดขวางที่สำคัญที่สุดและเป็น rate limiting step ของการซึมผ่านชั้นผิวหนัง ในการศึกษาพบว่ปัจจัยจากปริมาตรในการฉีด จำนวนครั้งของการฉีด ขนาดโมเลกุลของสารที่ฉีดและรูปแบบสูตรตำรับมีผลต่อการซึมผ่านผิวหนังโดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวง จากการศึกษาพบว่าค่าความสามารถในการแพร่ของยาในชั้นผิวหนังเมื่อใช้ไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวงมีค่าสูงมากกว่าในชั้น stratum corneum มาก การแพร่ในผิวหนังเป็นชนิด Fickian diffusion

### 3. การศึกษาความสามารถของไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีน

#### 3.1 การเตรียมไมโครนีดเดิ้ลรูปแบบรูกลวง (hollow type)

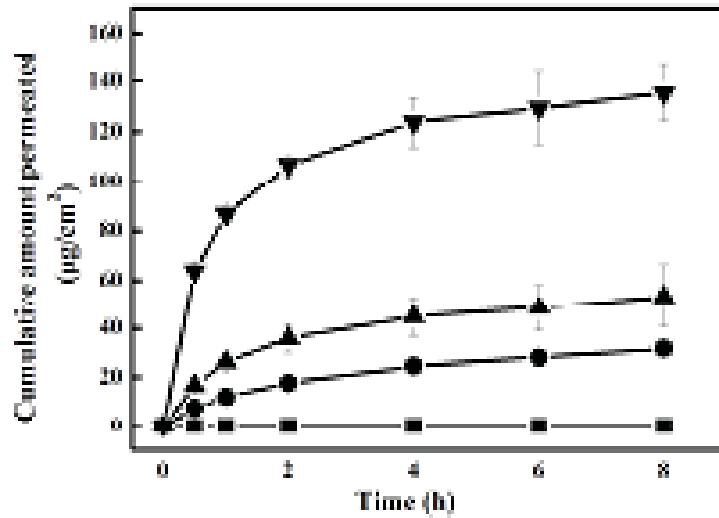
ในการวิจัยนี้สามารถเตรียมไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวงได้ โดยใช้ hypodermic needle เบอร์ 30 ต่อกับเข็มขนาดเล็กและใช้ silicone sheet เป็นตัวกำหนดความยาวเข็ม และให้เข็มแทงเข้าสู่ผิวหนังเป็นมุม 40 องศาเพื่อให้ปลายเข็มเข้าสู่ผิวหนังทั้งหมดไม่รื้อออกนอกผิวหนังในการทดลอง

#### 3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านของยาเปปไทด์และโปรตีนโดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวง

ในการศึกษาดังกล่าวจะเลือกศึกษาผลของไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวงต่อการซึมผ่านของ เปปไทด์และโปรตีน 3 ชนิดคือ peptide 8 amino acid (KKKKKKKK), superoxide dismutase และ bovine serum albumin เป็นตัวแทนสารและยาเปปไทด์และโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน และเลือกใช้สารเร่งการซึมผ่าน 3 ชนิดคือ ethanol, ethanol + menthol และ ethanol + menthol + limonene เป็นตัวแทนของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง ในการศึกษานี้พิจารณาผลการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนผ่านผิวหนังมนุษย์โดยศึกษาจากผลของปัจจัยต่าง ๆ 4 ปัจจัยคือ 1. กรณีไม่ได้มีการใช้ไมโครนีดเดิ้ลหรือสารเร่งการซึมผ่าน 2. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนีดเดิ้ลเพียงอย่างเดียว 3. กรณีใช้สารเร่งการซึมผ่านเพียงอย่างเดียว และ 4. กรณีที่มีการเจาะผิวหนังด้วยไมโครนีดเดิ้ลเพียงร่วมกับการให้สารเร่งการซึมผ่านร่วมกัน โดยทุกกรณีจะทำการศึกษาผลของระบบนำส่งไลโปโซมต่อการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนคือที่ใช้และไม่ใช้ไลโปโซมที่บรรจุเปปไทด์หรือโปรตีนเป็นระบบนำส่ง

#### ผลการซึมผ่านของ bovine serum albumin โดยใช้ไมโครนีดเดิ้ลชนิดรูกลวง

ทำการทดลองเริ่มต้นเพื่อหาปริมาณของโปรตีนที่เหมาะสมในการเปรียบเทียบเทียบการฉีดของโปรตีนเข้าสู่ผิวหนังโดยใช้ bovine serum albumin ฉีดเข้าสู่ผิวหนังในปริมาณที่ต่างกันตั้งแต่ 5, 10 และ 20 ไมโครลิตรตามลำดับ จากการศึกษาได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16 กรณีที่ไม่ได้ใช้ไมโครนีดเดิ้ลจะไม่พบการซึมผ่านของโปรตีนเข้าสู่ผิวหนังแม้เวลาจะผ่านไป 8 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณในการฉีดโปรตีนเข้าสู่ผิวหนังจาก 5  $\mu$ l เป็น 10  $\mu$ l และ 20  $\mu$ l จะทำให้เพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของโปรตีนเพิ่มขึ้น จะพบว่ากรณีไม่ได้ใช้ไมโครนีดเดิ้ลและให้โปรตีนซึมผ่านแบบ passive diffusion จะไม่พบตัวยาสำคัญที่สามารถแพร่ผ่านผิวหนังไปยัง receptor fluid เลย แสดงให้เห็นถึงความสำคัญ of ไมโครนีดเดิ้ลต่อการซึมผ่านผิวหนัง ในการทดลองเพื่อเปรียบเทียบต่อไปจะทำการเลือกใช้การฉีดโปรตีนและเปปไทด์ในปริมาณ 20  $\mu$ l ต่อกันไปจากการศึกษาจลนศาสตร์ของการปลดปล่อยตัวยาผ่านเข้าสู่ผิวหนังพบว่าการปลดปล่อยยาเป็นแบบ Higuchi (ตารางที่ 5) โดยค่าคงที่ของการปลดปล่อยตัวยามีค่ามากที่สุดกรณีการฉีด 20  $\mu$ l 10  $\mu$ l และ 5  $\mu$ l ตามลำดับและความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณยาที่ปลดปล่อยจากผิวหนังกับรากที่สองของเวลาที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงที่มี correlation coefficient มากกว่า 0.97



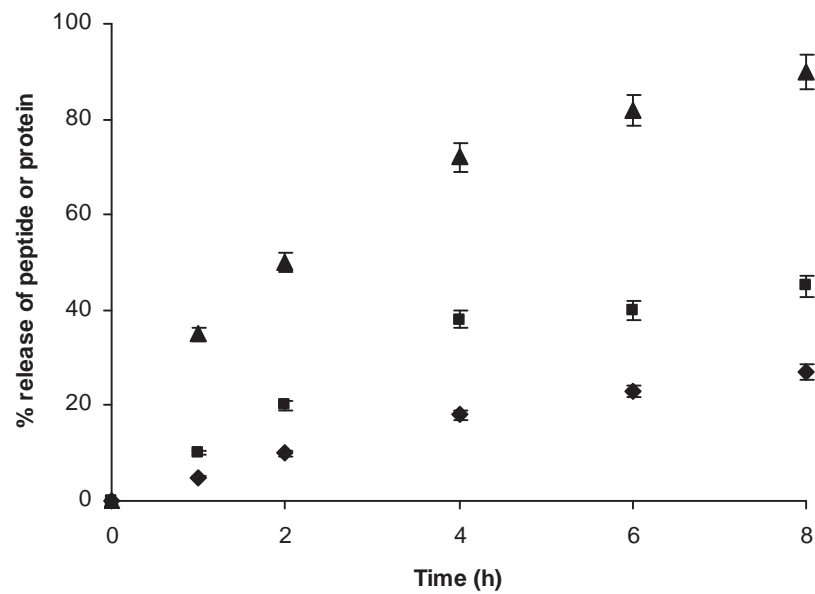
รูปที่ 16 การปลดปล่อยของ bovine serum albumin จากผิวหนังในปริมาณที่ฉีดแตกต่างกัน (◆) 20 µl (▲) 10 µl และ (●) 5 µl (■) passive diffusion

ตารางที่ 5 แสดงกลไกการปลดปล่อยของ bovine serum albumin จากผิวหนัง

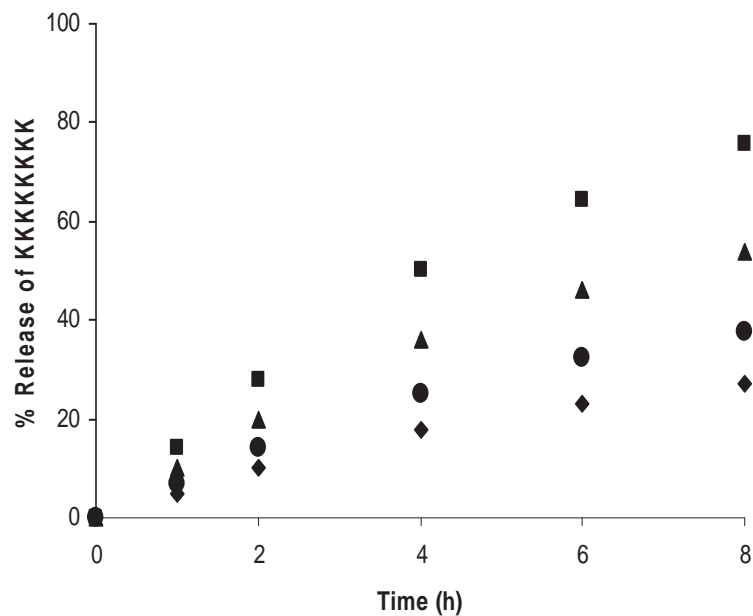
Injection volume [µl]	Higuchi model $Q = kt^{1/2}$	
	$k$ [nmol/cm <sup>2</sup> h <sup>1/2</sup> ]	$R^2$
5	0.75	0.998
10	1.2	0.979
20	3.2	0.974

เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบผลของขนาดโมเลกุลของสารต่อการซึมผ่านผิวหนังของ โปรตีนและเปปไทด์โดยเลือกใช้ คือ peptide 8 amino acid (KKKKKKKK), superoxide dismutase และ bovine serum albumin เป็นตัวแทนของสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก กลาง และใหญ่ตามลำดับ พบว่าการซึมผ่านผิวหนังของ peptide 8 amino acid (KKKKKKKK) ซึ่งเป็นเปปไทด์โมเลกุลขนาดเล็กจะมีการปลดปล่อยยาจากผิวหนังในอัตราเร็วที่สูงสุด รองลงมาคือ superoxide dismutase และ bovine serum albumin ตามลำดับ (รูปที่ 17) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าขนาดโมเลกุลของ เปปไทด์และโปรตีนที่ให้เข้าสู่ผิวหนังโดยไม่โครนิดเดิ้ลมีผลต่อการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และ โปรตีนโดยไม่โลกุลของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กจะแพร่ผ่านได้ดีกว่าโปรตีนซึ่งมีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นไปตามสมการของ Fick ซึ่งอธิบายว่า สารที่มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่จะแพร่ผ่านได้น้อยกว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก

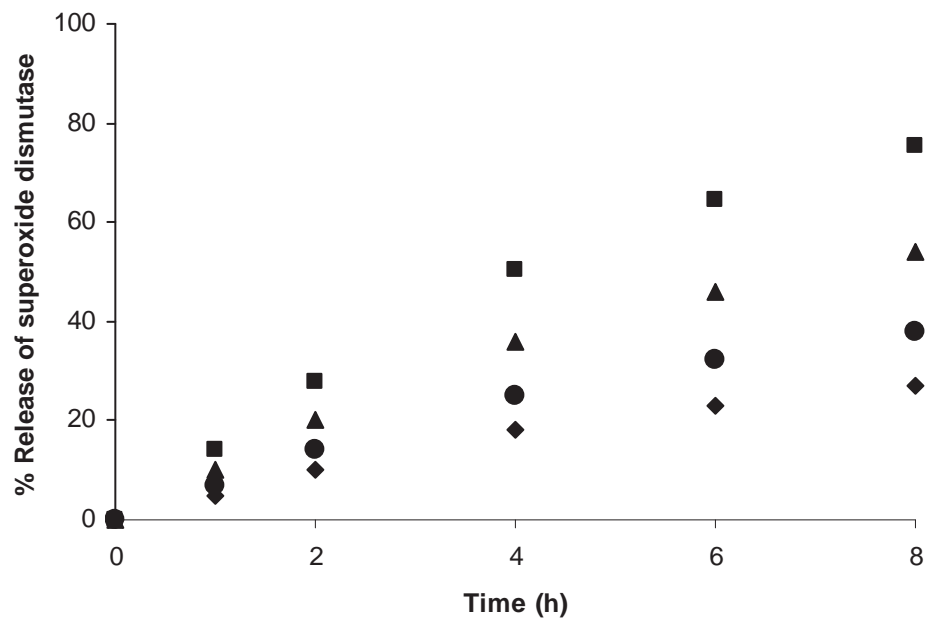




รูปที่ 17 ผลของขนาดโมเลกุลของเปปไทด์และโปรตีนต่อการซึมผ่านผิวหนังโดยใช้ไมโครนิดเดิ้ล  
(▲) KKKKKKKK และ (●) Bovine serum albumin (■) Superoxide dismutase

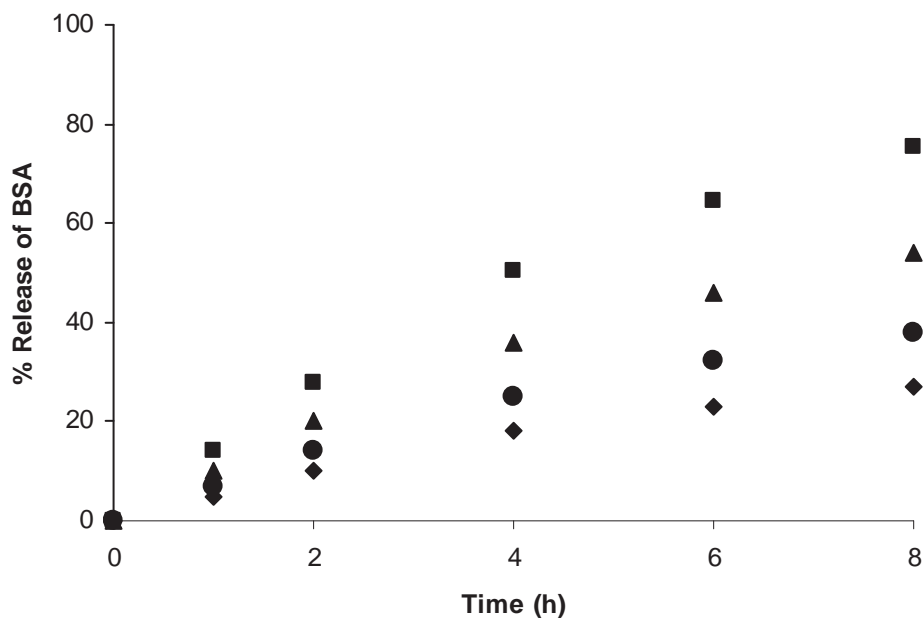


รูปที่ 18 ผลของสารเร่งการซึมผ่านในการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์ 8 อะมิโนแอซิด  
(◆) Passive diffusion (●) Ethanol 40% (▲) Ethanol 40%+menthol 5% และ (■)Ethanol 40%+menthol 5% + limonene 5%



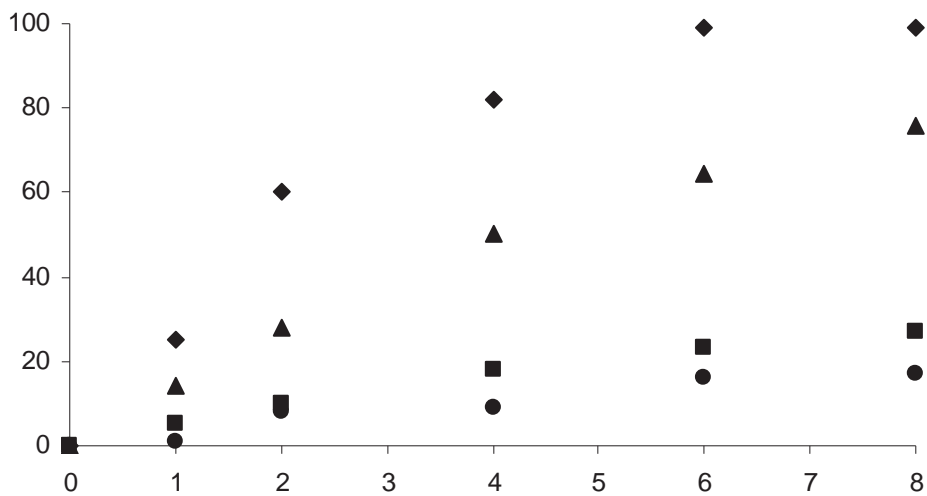
รูปที่ 19 ผลของสารเร่งการซึมผ่านในการซึมผ่านผิวหนังซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส

(◆) Passive diffusion (●) Ethanol 40% (▲) Ethanol 40%+menthol 5% และ (■)Ethanol 40%+menthol 5% + limonene 5%



รูปที่ 20 ผลของสารเร่งการซึมผ่านในการซึมผ่านผิวหนังในการซึมผ่านของอัลบูมินในการซึมผ่าน

ผิวหนังของอัลบูมิน (◆) Passive diffusion (●) Ethanol 40% (▲) Ethanol 40%+menthol 5% และ (■)Ethanol 40%+menthol 5% + limonene 5%



รูปที่ 21 ผลของสารเร่งการซึมผ่านและการใช้ไมโครนีดเดิลต่อการซึมผ่านของ BSA

(◆) Passive diffusion (●)Ethanol 40%+menthol 5% + limonene 5% in liposome (▲) Microneedle และ (■)Ethanol 40%+menthol 5% + limonene 5% in liposome plus microneedle

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์ของอัลบูมินที่ยังคงอยู่ในตำรับในแต่ละสูตรตำรับเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 1 เดือน

	4°C	25°C	40°C
Solution	98.5%	92%	60%
Liposome	99.2 %	97.2%	72.5%
Liposome+enhancers	98.9 %	97.2%	70.5%

จากการศึกษาผลของสารเร่งการซึมผ่านต่อการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนพบว่า การให้สารเร่งการซึมผ่านคือ ethanol (40%), ethanol (40%) + menthol (5%) และ ethanol (40%)+ menthol (5%)+ limonene (5%) สามารถเพิ่มการซึมผ่านของโปรตีนและเปปไทด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยสามารถเปรียบเทียบ enhancement ratio ได้ตามลำดับคือ ethanol (40%)+ menthol (5%)+ limonene (5%) (2.8 เท่า) มากกว่า ethanol (40%) + menthol (5%)( 2 เท่า) และ ethanol (1.4 เท่า) สำหรับ peptide 8 amino acid (รูปที่ 18) และให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันสำหรับ superoxide dismutase คือ ethanol (40%)+ menthol (5%)+ limonene (5%) (3.2 เท่า) มากกว่า ethanol (40%) + menthol (5%)( 2.4 เท่า) และ ethanol (1.6 เท่า) (รูปที่ 19) และกรณี bovine serum albumin คือ ethanol (40%)+ menthol (5%)+ limonene (5%) (2.9 เท่า) มากกว่า ethanol (40%) + menthol (5%)( 2.5 เท่า) และ ethanol (1.3 เท่า) (รูปที่ 20) เนื่องจากสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังมีกลไกที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวหนัง ทำให้มีการจัดเรียงตัวของชั้นไขมันที่

เรียงตัวไม่เป็นระเบียบมากขึ้นทำให้โปรตีนและเปปไทด์สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้มากขึ้น นอกจากนี้เอธานอลสามารถเพิ่มการ partition ของตัวยาสำคัญหลายชนิดเป็นผลให้การผลึกยาเข้าสู่ผิวหนังง่ายขึ้น

จากผลการทดลองการให้ยาในรูปแบบไมโครนีดเดิ้ลจะเพิ่มการซึมผ่านของเปปไทด์และโปรตีนได้ 5-7 เท่าอย่างไรก็ตามเมื่อให้ร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังจะทำให้ประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังเพิ่มขึ้นเป็น 8-10 เท่า (รูปที่ 18-20) และกรณีให้ร่วมกันในรูปแบบไลโปโซมเมื่อทดสอบกับ bovine serum albumin liposome (รูปที่ 21) จะพบว่าการซึมผ่านจะเพิ่มขึ้นจาก 10 เท่าเป็น 12 เท่าแสดงให้เห็นถึงผลการเพิ่มประสิทธิภาพ (synergistic effect) เมื่อให้ร่วมกันในหลายรูปแบบ (combination) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของสูตรตำรับและวิธีการให้ยาต่อประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังของเปปไทด์และโปรตีนในร่างกาย

ในการศึกษาความคงตัวของโปรตีนของตำรับที่เตรียมได้ในรูปแบบไลโปโซมและสารละลายเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 6) พบว่า ความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะมีความคงตัวทั้งทางกายภาพ และ เคมีดีที่สุด โดยเฉพาะตำรับในรูปแบบของไลโปโซมที่บรรจุ bovine serum albumin จะมีความคงตัวสูงที่สุด ดังนั้นจึงควรเก็บตำรับไลโปโซมที่เตรียมได้ในที่มีอุณหภูมิที่ต่ำ

## เอกสารอ้างอิง

- Banks SL, Pinninti RR, Gill HS, Crooks PA, Prausnitz MR, Stinchcomb AL. Flux across of microneedle-treated skin is increased by increasing charge of naltrexone and naltrexol in vitro. *Pharm. Res.* 2008; 25:1677-1685.
- Cormier M, Johnson B, Ameri A, Nyam L, Libiran DD, Zhang P, Daddona P. Transdermal delivery of demopressin using a coated microneedle array patch system. *J. Control. Release.* 2004; 97: 503-511.
- Coulman SA, Barrow D, Anstey A, Gateley C, Morrissey A, Wilke N, Allender C, Brain K, Birchall JC. Minimally invasive cutaneous delivery of macromolecules and plasmid DNA via microneedles. *Curr Drug Deliv.* 2006;3:65-75.
- Davis SP, Martanto W, Allen MG, Prausnitz MR. Hollow metal microneedles for insulin delivery to diabetic rats. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2005;52(5):909-915.
- Donnelly RF, Morrow DI, McCarron PA, Woolfson AD, Morrissey A, Juzenas P, Juzeniene A, Iani V, McCarthy HO, Moan J. Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: potential for enhanced topical photodynamic therapy. *J Control Release.* 2008;129:154-162
- Gardeniers J.G.E., Luttge J.W., Berenschot J.W., DeBoer M.J., Yeshuran Y., Hefetz M. Silicon micromachined hollow microneedles for transdermal liquid transport. *J. Microelectromech. Syst.* 2003; 12, 855-861.
- Gill HS, Prausnitz MR. Coating formulations for microneedles. *Pharm Res.* 2007 Jul;24(7):1369-80.
- Henry S., McAllister D.V., Allen M.G., Prausnitz M.R. Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 1998; 87, 922-925.
- Ito Y, Hagiwara E, Saeki A, Sugioka N, Takada K. Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin. *Eur J Pharm Sci.* 2006;29:82-88.
- Lee JW, Park JH, Prausnitz MR. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials.* 2008;29(13):2113-2124.
- Lin WQ, Cormier A, Samiee A, Griffin A, Johnson B, Teng CL, Hardee GE, Daddona PE. Transdermal of antisense oligonucleotide with microprojection patch (Macroflux®) technology. *Pharm. Res.* 2001; 18: 1789-1793.

- Martanto W, Davis S, Holiday N, Wang J, Gill H, Prausnitz M. Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo. Proceedings of international symposium on Controlled Release Bioactive material. 2003; 666.
- Martanto W, Davis SP, Holiday NR, Wang J, Gill HS, Prausnitz MR. Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo. Pharm Res. 2004; 21:947-952.
- Matriano JA, Cormier M, Johnson B, Young WA, Buttery K, Nyam PE, Daddona P. Macroflux microprojection array patch technology: a new and efficient approach for intracutaneous immunization. Pharm. Res. 2002; 19: 63-70.
- McAllister DV, Wang PM, Davis SP, Park JH, Canatella PJ, Allen MG, Prausnitz MR. Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):13755-60.
- Mikszta JA, Harvey NG, Dean CH, Brittingham JM, Huang J, Sullivan VJ, Dyas B, Roy CJ, Ulrich RG. Microneedle-based intradermal delivery of the anthrax recombinant protective antigen vaccine. Infect Immun. 2006; 74:6806-6810.
- Mikszta JA, Alarcon JB, Brittingham JM, Sutter DE, Pettis RJ, Harvey NG. Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery. Nat. Med. 2002; 8: 415-419.
- Ngawhirunpat T, Opanasopit P, Prakongpan S. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004; 58, 645-651.
- Ngawhirunpat T, Opanasopit P, Rojanarata T, Panomsuk S, Chanchome L. Evaluation of simultaneous permeation and metabolism of methyl nicotinate in human, snake, and shed snake skin. Pharm. Dev. Tech. 2008;13,75-83.
- Oh JH, Park HH, Do KY, Han M, Hyun DH, Kim CG, Kim CH, Lee SS, Hwang SJ, Shin SC, Cho CW. Influence of the delivery systems using a microneedle array on the permeation of a hydrophilic molecule, calcein. Eur J Pharm Biopharm. 2008; 65:79-86.
- Park J.h., Allen, M.G., Prausnitz, M.R. Biodegradable polymer microneedles: fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. J. Control. Release. 2005; 104: 51-66.
- Pearson M, Allender C, Brain K, Anstey A, Gateley C, Wilke N, Morrissey A, Birchall J. Gene delivery to the epidermal cells of human skin explants using microfabricated microneedles and hydrogel formulations. Pharm Res. 2008;25:407-416
- Prausnitz M.R. Microneedles for transdermal drug delivery. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2004; 56, 581-287.

- Roxhed N, Samel B, Nordquist L, Griss P, Stemme G. Painless drug delivery through microneedle-based transdermal patches featuring active infusion. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2008 Mar;55(3):1063-71.
- Sivamani RK, Stoeber B, Wu GC, Zhai H, Liepmann D, Maibach H. Clinical microneedle injection of methyl nicotinate: stratum corneum penetration. *Skin Res Technol.* 2005;11(2):152-156.
- Verbaan FJ, Bal SM, van den Berg DJ, Dijksman JA, van Hecke M, Verpoorten H, van den Berg A, Luttge R, Bouwstra JA. Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method. *J Control Release.* 2008;128(1):80-88.
- Verbaan FJ, Bal SM, van den Berg DJ, Groenink WH, Verpoorten H, Lüttge R, Bouwstra JA. Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin. *J Control Release.* 2007;117:238-245.
- Wada Y, Nakajima K, Yamazaki J, Seki T, Sugibayashi K, Morimoto Y. Influence of composition of l-menthol-ethanol-water ternary solvent system on the transdermal delivery of morphine hydrochloride. *Biol Pharm Bull.* 1993;16:600-60.
- Widera G, Johnson J, Kim L, Libiran L, Nyam K, Daddona PE, Cormier M. Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine.* 2006 ;24(10):1653-1664.
- Wu XM, Todo H, Sugibayashi K. Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis. *J Control Release.* 2007;118:189-195.
- Wu Y, Qiu Y, Zhang S, Qin G, Gao Y. Microneedle-based drug delivery: studies on delivery parameters and biocompatibility. *Biomed Microdevices.* 2008, 12, 266-274.
- Xie Y, Xu B, Gao Y. Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array. *Nanomedicine.* 2005;1:184-190.

## OUTPUTS ที่ได้จากโครงการ

### 1. ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 9 ฉบับ

1. Amornrat Viriyaraj, **Tanasait Ngawhirunpat**, Monrudee Sukma, Prasert Akkaramongkolporn, Uracha Ruktanontchai, Praneet Opanasopit. Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-ornanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2009, 14 (6): 665-671.
2. Nanthida Wonglertnirant, Hiroaki Todo, Praneet Opanasopit, **Tanasait Ngawhirunpat**, Kenji Sugibayashi. Molecular delivery into skin using a hollow microneedle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010, 33 (12): 1988-1993.
3. **Tanasait Ngawhirunpat**, Theerasak Rojanarata, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit. Fabrication of capsaicin loaded polyvinyl alcohol electrospun nanofibers. *Advanced Materials Research*. 2011, 338: 42-45. (Corresponding author)
4. Nanthida Wonglertnirant, **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi. A hollow microneedle carrier for enhancing skin penetration of large molecular compounds. *Advanced Materials Research*. 2011, 194-196: 549-553. (Corresponding author)
5. Ponwanit Jarenpattakrun, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, **Tanasait Ngawhirunpat**. Formulation and evaluation of isosorbide dinitrate acrylic matrix transdermal patches. *Advanced Materials Research*. 2011, 197-198: 1217-1220. (Corresponding author)
6. Sureewan Duangjit, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, **Tanasait Ngawhirunpat**. Characterization and in vitro skin permeation of meloxicam-loaded liposomes versus transfersomes. *Journal of Drug Delivery*. 2011, Article ID 418316: 1-9. (Corresponding author)
7. Sureewan Duangjit, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, **Tanasait Ngawhirunpat**. Effect of edge activator on characteristic and in vitro skin permeation of meloxicam loaded in elastic. *Advanced Materials Research*. 2011, 194-196: 537-540. (Corresponding author)
8. Nanthida Wonglertnirant, **Tanasait Ngawhirunpat**, Mont Kumpugdee-Vollrath. Evaluation of the mechanism of skin enhancing surfactants on the biomembrane of shed snake skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012, 35 (4): 1-9. (Corresponding author)



9. **Tanasait Ngawhirunpat**, Narumon Worachun, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Suwannee Panomsuk. Cremophor RH40-PEG400 microemulsions as transdermal drug delivery carrier for ketoprofen. Pharmaceutical Development and Technology. 2012 (accepted as reprint, Corresponding author)

**2. ผลงานที่เสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง**

1. Nanthida Wonglertnirant, **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi. Skin delivery of high molecular weight hydrophilic compound using hollow microneedles. AFPS conference, 16 October 2009, Fukuoka, Japan.

**3. การนำวิจัยไปใช้ประโยชน์**

เชิงวิชาการ นำไปใช้ในการเรียนการสอนระดับปริญญาเอกที่คณะเภสัชศาสตร์ ม.ศิลปากรและ  
เป็นหัวข้อสร้างนักวิจัยปริญญาเอก ชื่อ น.ส. นันทิดา วงศ์เลิศนรินทร์ และ น.ส. สุรวิทย์ ดวงจิตต์  
โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก

# ภาคผนวก

RESEARCH ARTICLE

# Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use

Amornrat Viriyaroj<sup>1</sup>, Tanasait Ngawhirunpat<sup>2</sup>, Monrudee Sukma<sup>2</sup>, Prasert Akkaramongkolporn<sup>2</sup>, Uracha Ruktanonchai<sup>3</sup>, and Praneet Opanasopit<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Srinakarinwirot University, Nakhon Nayok, <sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhonpathom 73000, and <sup>3</sup>National Nanotechnology Center, Thailand Science Park, Pathumthani, 12120, Thailand

## Abstract

The objective of this study is to prepare the  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes and investigate their physicochemical properties and antioxidant activity intended for cosmetic applications. Liposomes, Composing phosphatidylCholine (PC) and Cholesterol (Chol), CHAPS or sodium taurocholate (NaTC) were prepared by sonication method.  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes were prepared by using 3, 5 and 10%  $\gamma$ -oryzanol as an initial concentration. The formulation factors in a particular type and composition of lipid and initial drug loading on the physicochemical properties (i.e., particle size, zeta potential, entrapment efficiency, drug release) and antioxidant activity were studied. The particle sizes of bare liposomes were in nanometer range. The  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes in formulations of PC/CHAPS and PC/NaTC liposomes were smaller than PC/Chol liposomes. The incorporation efficiency of 10%  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/Chol liposomes was less than  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes allowing higher in vitro release rate due to higher free  $\gamma$ -oryzanol in buffer solution. The antioxidant activity of  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes was not different from pure  $\gamma$ -oryzanol. Both  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes were showed to enhance the antioxidant activity in NHF cells.  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/Chol liposomes demonstrated the lowest cytotoxicity in NHF cells. It was conceivably concluded that liposomes prepared in this study are suitable for  $\gamma$ -oryzanol incorporation without loss of antioxidant activity.

**Keywords:** Liposomes; antioxidant; in vitro release; gamma-oryzanol

## Introduction

Gamma-oryzanol, a main constituent in rice bran oil, contain a mixture of at least 10 phytosteryl ferulates where cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartenyl ferulate and campesterol ferulate have been identified as the major components, accounting for 80% of  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil.<sup>[1]</sup> It has been reported to exhibit many properties such as reduction in serum cholesterol levels, inhibition of the platelet aggregation, possession in anti-inflammatory effect, improvement of the stability of food and stimulation of blood circulation under the skin.<sup>[2–4]</sup> It has also been proposed as a natural antioxidant to improve the stability of foods.<sup>[5,6]</sup>  $\gamma$ -oryzanol is used as an antioxidant in the conservation of oils and beverages, presenting a synergetic effect in association

with vitamin E.<sup>[7]</sup> It is also described as a multifunctional cosmetic agent: its properties consist on the stimulation of sebaceous glands and in the adsorption of UV radiation.<sup>[8]</sup> Therefore  $\gamma$ -oryzanol is an interesting natural antioxidant compound for both pharmaceutical and food application. For cosmetic purpose, it was used as an active component to prevent skin from aging and protect the skin from free radicals in cosmetic products such as sunscreens and hair care products, which ones are already available in the market.

Although the skin as a route for drug delivery can offer many advantages, including avoidance of first-pass metabolism, lower fluctuations in plasma drug levels, targeting of the active ingredient for a local effect and good patient compliance, the barrier nature of skin makes it difficult for most drugs to penetrate into and

Address for Correspondence: Praneet Opanasopit, PhD, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhonpathom 73000, Thailand. Tel: +66 34 255800. Fax: +66 34 255801. E-mail: praneet@email.pharm.su.ac.th

(Received 3 February 2009; revised 16 March 2009; accepted 16 March 2009)

permeate through it. During the past decades there has been wide interest in exploring new techniques to increase drug absorption through skin such as penetration enhancers as well as other chemical methods. One of the most controversial methods to increase drug transport across the skin is the use of vesicles or liposomes. Topical delivery of drugs by lipid vesicles has evoked a considerable interest. Liposomes are colloidal particles ranging in diameters from 50 nm to several microns formed as concentric biomolecular layers that are capable of encapsulating drugs. Liposomes have been widely used as vehicle in the pharmaceutical and cosmetic field as drug delivery systems due to their versatility and clinical efficacy. They can be administered by several routes such as the oral,<sup>[9]</sup> ocular,<sup>[10]</sup> parenteral,<sup>[11]</sup> nasal,<sup>[12]</sup> and topical.<sup>[13]</sup> There are many examples of cosmetic products in which the active ingredients are encapsulated in vesicles. These include humectants such as glycerol and urea, sunscreens and tanning agents, enzymes. Although there are few commercial topical products containing encapsulated drugs, there is a considerable body of research in the topic. A variety of encapsulating systems have been evaluated including liposomes, deformable liposomes or transfersomes, ethosomes and niosomes. Although it has been generally accepted that the use of liposomes with proper composition should result in increased drug transport across the skin, many questions arise about the mechanism of action of these vesicular formulations. The first publications on interactions between liposomes and skin appeared in 1980.<sup>[14]</sup> After these first papers, a large number of studies were initiated and conflicting results continued to be published concerning liposomes effectiveness. PhosphatidylCholine (PC) from soybean or egg yolk is the most common composition although many other potential ingredients have been evaluated.<sup>[15]</sup> Cholesterol (Chol) added to the composition tends to stabilize the structure thereby generating more rigid liposomes (conventional liposomes). Recently, it became evident that, in most cases, conventional liposomes are of little or no value as carriers for transdermal drug delivery as they do not deeply penetrate skin, but rather remain confined to upper layers of the stratum corneum.<sup>[16]</sup> The previous research studies reported that many factors have influenced on the percutaneous penetration behavior of liposomes for example liposome composition.<sup>[17]</sup> Touitou et al. compared penetration enhancers with liposomes. Interestingly, they observed that liposomes can act as an excellent reservoir, while the penetration enhancers increased the drug transport through the skin.<sup>[18]</sup> This group developed also a new system in which liposomes are combined with ethanol. Most probably the ethanol decreases the interfacial tension of the vesicles and makes the vesicles more elastic. These systems are referred to as ethosomes.

Cevc's group introduced Transfersomes<sup>®</sup>, which are elastic vesicles prepared from lipids and an edge activator, such as a single-chain lipid or surfactant.<sup>[19,20]</sup> An edge activator is often a single chain surfactant, having a high radius of curvature, that destabilizes lipid bilayers of the vesicles and increases deformability of the bilayers. Sodium cholate, sodium deoxycholate, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80 and dipotassium glycyrrhizinate were employed as edge activators.<sup>[16]</sup> Only at the optimal balance between the amount of edge activator and the amount of bilayer forming lipid, are the vesicles elastic. If the edge activator level in the vesicles is too low, the vesicles are rigid and if the concentration edge activator is too high, the vesicles turn into micelles. It has been suggested that as a result of the hydration force in the skin, transfersomes due to their elastic nature can be squeezed through stratum corneum lipid lamellar regions. These results are very encouraging and certainly show that transfersomes have important advantages over vesicles prepared from only double chained phospholipids and cholesterol (conventional liposomes). It would be of extreme interest to study new edge activator to prepare transfersomes. Therefore, in this study  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposome with different compositions was prepared to investigate the physicochemical property intended for cosmetic purpose. The cholesterol (Chol) was added to PC to form conventional liposomes. Surfactants (CHAPS, (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate) or sodium taurocholate (NaTC)) as an edge activator were added to PC to form an elastic or transfersomes. The formulation factors such as initial amount of drug added, type of surfactants (CHAPS and NaTC) on the physicochemical properties, percentage yield, percentage drug release and antioxidant activity of  $\gamma$ -oryzanol loaded-liposomes were evaluated.

## Materials and method

### Materials

$\gamma$ -oryzanol was purchased from Connell Brothers Co., Thailand. PhosphatidylCholine (PC, Phospholipon 90 G, purity 92.0–98.0%) was used as a gift from Phospholipid GMBH, Germany. Cholesterol (Chol), (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl ammonio]-1-propanesulfonate) (CHAPS) and sodium taurocholate (NaTC), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), Tris, Triton-X 100 were from Sigma-Aldrich Co., USA. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was from BDH Laboratories, UK. Minimum Essential Medium (MEM), fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA and penicillin-streptomycin were purchased from Gibco BRL (Rockville, MD, USA). Dialysis bag CelluSep<sup>®</sup> T2 Membranes 6-8000 MWCO) was obtained from Uptima-Interchim, Montluçon, France.

All other reagents and solvents were commercially available and of analytical grade.

## Methods

### Preparation of liposomes

Different formulations composed of bilayer forming PC, in combination of Chol, CHAPS or NaTC, in molar ratio of 10:2 were prepared by sonication method. Briefly, PC, Chol, CHAPS and NaTC were separately dissolved in chloroform:methanol (2:1 v/v). The materials were deposited in a test tube and the solvents were evaporated with nitrogen gas. The lipid film was placed in a desiccator connected to a vacuum pump at least 6 h to remove remaining organic solvent. The dried lipid film was hydrated with Tris buffer (20 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 7.1). Following hydration, the dispersion was sonicated in bath sonication for 10 minute and then in probe sonicator for each of 30 min, 2 cycles. For  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes, the solution of  $\gamma$ -oryzanol in solvent was mixed with a solution of lipid mixture during preparation. The procedure of production of  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes was the same as bare-liposomes.

### Particle size and zeta potential

The mean particle size and zeta potential were measured using photon correlation spectroscopy (PCS) (NanaZS4700 nanoseries, Malvern Instruments, UK). All the formulations were analyzed after appropriate dilution with filtered deionized water. Each value reported was the average of three measurements.

### Incorporation efficiency and loading capacity

The incorporation efficiency of gamma-oryzanol in liposomes was evaluated by addition 0.1%w/v Triton X-100 solution (1:1 ratio). The mixtures was stirred for 30 min and centrifuged at 4°C, 15,000 rpm for 15 min (Sorvall Biofuge Stratos, USA). The supernatant was directly determined by using UV spectroscopy at 326 nm. Each sample was run in triplicate. The value of drug incorporation efficiency and loading capacity of  $\gamma$ -oryzanol in each formulation were calculated as follows:

$$\% \text{ incorporation efficiency} = (C_L/C_i) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Loading capacity} = C_L/A \quad (2)$$

where,  $C_L$  is the amount of  $\gamma$ -oryzanol measured in the liposomes,  $C_i$  is the initial amount of  $\gamma$ -oryzanol added in liposomes, and A is the weight of lipid in the liposome formulation.

### In vitro $\gamma$ -oryzanol release

The in vitro release studies of  $\gamma$ -oryzanol were operated using a dialysis bag (MWCO 6000-8000 CelluSep®) in a

shaker incubator (Model:SI4, Amerex Instruments, Inc. Lafayette, CA, USA) at 150 rpm. One milliliter of 10%  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes was placed in the dialysis bag, and then immersed in 15 mL Tris buffer solution at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . At certain time intervals of 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 h, aliquots of the releasing medium were withdrawn and the same volume of fresh medium was added. The sample solution was analyzed by UV spectroscopy at 326 nm. All experiments were performed in triplicate.

### DPPH free radical-scavenging activity

The antioxidant property was determined by the DPPH free radical-scavenging activity. The DPPH free radical-scavenging activities of  $\gamma$ -oryzanol were determined according to the method described by Chen et al.<sup>[21]</sup> Briefly, dilutions of  $\gamma$ -oryzanol or  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes (in 100% DMSO) were treated with a solution of 100  $\mu\text{M}$  DPPH in ethanol for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . Scavenging potential was compared with a solvent control (0% radical scavenging) used as a blank. Radical scavenging potential was determined photometrically by reaction with DPPH free radicals and the absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader (Universal Microplate Analyzer, Model AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, CT, USA). The antioxidant activity of  $\gamma$ -oryzanol and  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes was expressed as  $\text{IC}_{50}$ , which was defined as the concentration of  $\gamma$ -oryzanol required for inhibition of the formation of DPPH radicals by 50%.

### Antioxidant activity in cell culture

Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells were plated in 90  $\mu\text{L}$  of Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% FBS at a density of 8000 cells/well in 96-well plates. When the cultures reached confluency (typically, 48 h after plating), all tested formulations diluted with DMSO were added at 10  $\mu\text{L}$ /well. At 16 h post-incubation, the cell cultures received a culture medium supplemented with 125  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  solution at 100  $\mu\text{L}$ /well. After 3 h, 25  $\mu\text{L}$  of MTT (5 mg/mL) was added to each well and then incubated for 4 h. Then, all media were removed and 100  $\mu\text{L}$  of DMSO was added. Plates were incubated for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  and the absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader; % cell viability were then calculated and compared with control.

### Cell cytotoxicity

NHF cells were plated in 90  $\mu\text{L}$  of MEM supplemented with 10% FBS at a density of 8000 cells/well in 96-well plates. When the cultures reached confluency (typically, 48 h after plating), all tested formulations at varying concentrations were added at 10  $\mu\text{L}$ /well. After 16 h post-incubation, 25  $\mu\text{L}$  of 5 mg/mL MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromide]

was added to each well and then incubated for 4 h. Then, all media were removed and 100  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide was added. Plates were incubated for 30 min at 37°C and the absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader; % cell viability were then calculated and compared with control.

### Statistical analysis

All results were expressed as mean  $\pm$  SD. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD post hoc test. Differences of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results and discussion

### Characterization of $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes

Leaving all the other parameters constant, in this study the two variables composed of initial amount of  $\gamma$ -oryzanol loaded in liposomes and type of surfactant (CHAPS and NaTC) were varied. All formulations were produced at under the same condition during the production process. Particle size analysis of all formulations was monitored. The particle sizes of conventional liposomes (PC/Chol) were less than 100 nm (Table 1). This result indicated that this method could produce small unilamellar liposome (SUV). The mean particle size of formulation composed of PC/CHAPS was larger than that of PC liposome. However, no remarkable increase in particle size was observed in the formulations composed of PC/NaTC and PC-Chol. This result is in accordance

**Table 1.** Particle size and zeta potential of formulations composed of different compositions

Composition	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
PC	72.40 $\pm$ 1.10	-0.40 $\pm$ 1.30
PC/Chol	63.00 $\pm$ 0.60	-0.60 $\pm$ 0.60
PC/CHAPS	126.67 $\pm$ 1.10	-4.03 $\pm$ 0.18
PC/NaTC	44.59 $\pm$ 1.55	-17.93 $\pm$ 1.17
PC/Chol/3% $\gamma$ -oryzanol	63.70 $\pm$ 2.80	-0.40 $\pm$ 1.60
PC/Chol/5% $\gamma$ -oryzanol	83.90 $\pm$ 1.20	-2.90 $\pm$ 0.70
PC/Chol/10% $\gamma$ -oryzanol	97.40 $\pm$ 1.50	-2.50 $\pm$ 0.60
PC/CHAPS/3% $\gamma$ -oryzanol	69.10 $\pm$ 1.04	-4.63 $\pm$ 0.07
PC/CHAPS/5% $\gamma$ -oryzanol	62.10 $\pm$ 0.80	-2.10 $\pm$ 0.11
PC/CHAPS/10% $\gamma$ -oryzanol	57.70 $\pm$ 0.80	-5.10 $\pm$ 1.30
PC/NaTC/3% $\gamma$ -oryzanol	130.60 $\pm$ 40.78	-10.70 $\pm$ 0.26
PC/NaTC/5% $\gamma$ -oryzanol	37.93 $\pm$ 0.45	-13.03 $\pm$ 1.02
PC/NaTC/10% $\gamma$ -oryzanol	39.30 $\pm$ 0.50	-5.20 $\pm$ 1.00

with previous report in that the intercalation of CHAPS in to lipid bilayers can induce vesicle fusible.<sup>[22]</sup> The addition of  $\gamma$ -oryzanol, a hydrophobic compound, led to smaller particle size in formulation composed of PC/CHAPS and PC/NaTC. This suggests that the insertion of  $\gamma$ -oryzanol molecules induce the disintegration of vesicles or the formation of transient structure. Although previous work reported that transient structure was not formed at the molar ratio of PC/CHAPS and PC/NaTC of 10:2 prepared by dialysis membrane at 25°C.<sup>[22,23]</sup> One possible explanation regarding this discrepancy is the different of experimental method. Due to high energy of sonication method used in this experiment may lead to higher partition of surfactant in bilayers resulting in the coexistence of vesicles and transient structure in PC/CHAPS and PC/NaTC at molar ratio of 10:2.

The zeta potential of formulation composed of PC/NaTC was more negative than other formulations due to the anionic charge at head group of NaTC. Whereas the zeta potentials in the formulations composed of PC/CHAPS and PC/Chol were not different from that in PC liposomes. Since CHAPS is a zwitterionic molecule and Chol is a non-ionic molecule. They have no net charge in their molecules thus the surface charges were not apparently altered in the formulations of PC/CHAPS and PC/Chol.

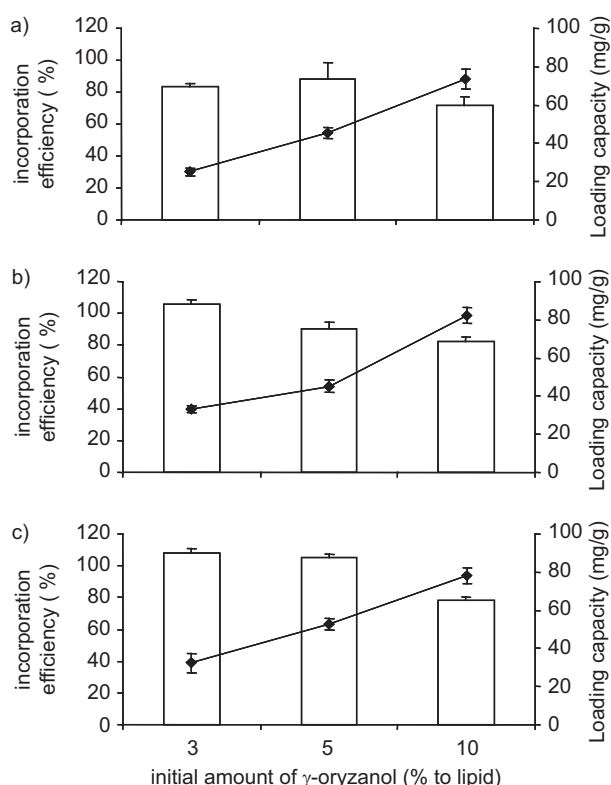
### Incorporation efficiency and loading capacity

The incorporation efficiency and loading capacity of  $\gamma$ -oryzanol in different composition of surfactants and initial amount of  $\gamma$ -oryzanol loaded in liposomes are shown in Figure 1. In all liposomes, with and increase in the initial amount of  $\gamma$ -oryzanol from 1, 5 and 10% of lipid weight, the loading capacity appeared to increase from 1–10% of lipid weight. High percentage incorporation efficiency of 72–105% was obtained. It was also found that increasing initial amount of  $\gamma$ -oryzanol from 1, 5 and 10% of lipid weight, decreased the percentage incorporation efficiency. The percentage incorporation efficiency of  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/Chol liposomes was less than PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes. This might be attributed to the different structures of Chol, CHAPS and NaTC. Since Chol has a planar structure while CHAPS and NaTC have wedge structure, the available areas for loading the hydrophobic molecule in bilayer of PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes were more than PC/Chol liposomes leading to higher percentage incorporation efficiency of  $\gamma$ -oryzanol.

### In vitro $\gamma$ -oryzanol release

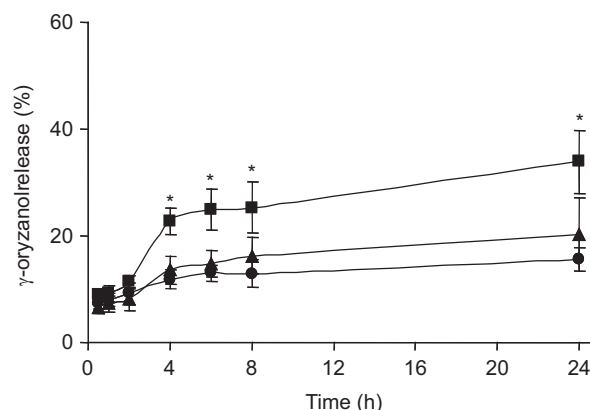
The highest loading capacity was investigated in 10% initial amount of  $\gamma$ -oryzanol loaded in all type of liposomes. Therefore, 10%  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes





**Figure 1.** The effect of initial amount of  $\gamma$ -oryzanol (3, 5 and 10%) added in liposomes on the percentage incorporation efficiency (white bars) and loading capacity (filled diamond) of  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes composed of different compositions: (a) PC/Chol, (b) PC/CHAPS, (c) PC/NaTC. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.

were selected for in vitro release study. The release profiles of  $\gamma$ -oryzanol from the prepared 10%  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposome formulations are shown in Figure 2. All formulations showed a slow release of  $\gamma$ -oryzanol. The release of  $\gamma$ -oryzanol from liposomes in all formulations was less than 40% over 24 h. This might be attributed to a preferable of  $\gamma$ -oryzanol molecule to adhere with PC molecule were than dissolve in receptor medium. However, the significant difference in the percentage of  $\gamma$ -oryzanol released in the receptor compartment at 24 h can be observed (Figure 2). The  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/Chol liposomes showed highest in vitro release at 24 h of 33.89%, whereas in vitro release of PC/CHAPS liposomes (20.28%) and PC/NaTC liposomes (15.62%) were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than PC/Chol liposomes. The results indicated that the type of lipid composition affected the release of  $\gamma$ -oryzanol. This might attribute to the formation of the transient structure such as bilayer fragments and/or mixed micelles leading to entrapment of the free drug into these mixed micelles resulted slower  $\gamma$ -oryzanol molecule diffuse from the formulation to the receptor medium. Andrieux et al. showed that the transition of the vesicles into mixed micelles is achieved at a



**Figure 2.** Release profiles of 10%  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes composed of different compositions (■) PC/Chol, (▲) PC/CHAPS, (●) PC/NaTC. Differences values \* were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

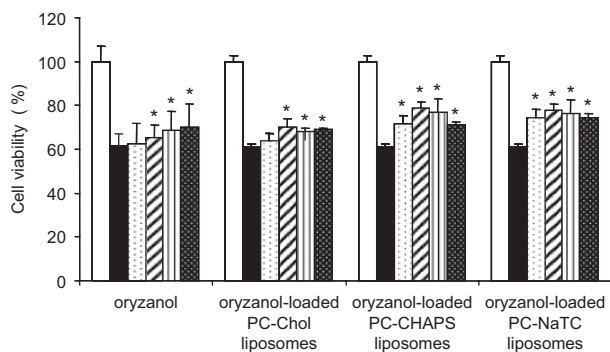
total concentration of NaTC added lower critical micelles concentration (CMC).<sup>[24]</sup> This result was consistent with the particle size, which showed that the particle size of PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes were smaller than PC/Chol liposomes.

#### DPPH free radical-scavenging activity

The scavenging effect of  $\gamma$ -oryzanol was investigated on DPPH radicals. The inhibition percentage was proportional to the concentration of  $\gamma$ -oryzanol. The  $\gamma$ -oryzanol exhibited  $IC_{50}$  of 32.51  $\mu$ g/mL. Additionally, the inhibition percentage of  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC-Chol liposomes (38.72  $\mu$ g/mL), PC/CHAPS liposomes (35.21  $\mu$ g/mL) and PC/NaTC liposomes (40.05  $\mu$ g/mL) were not significantly different from pure  $\gamma$ -oryzanol. This demonstrated that the antioxidant property of  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes was still effective.

#### Antioxidant activity

In order to compare the influence of the liposomes on antioxidant activity, the cell viability of the  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes formulations-treated cell after the induction of free radical in NHF cells using 125  $\mu$ M of hydrogen peroxide was observed. Antioxidant activities of pure  $\gamma$ -oryzanol and  $\gamma$ -oryzanol loaded in varying formulations are showed in Figure 3. Statistical analysis was used to consider the antioxidant activity comparing between  $H_2O_2$ -treated cells with formulations and  $H_2O_2$ -treated cells. No antioxidant activity was found in the bare-liposomes (PC/CHAPS liposomes, PC/NaTC liposomes and PC/Chol liposomes). Dose-dependency values of antioxidant activity of pure  $\gamma$ -oryzanol ranging from 0.01–10  $\mu$ M were found with a significant increase in cell viability. The antioxidation activity of  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes was significantly different from  $H_2O_2$ -treated cells from

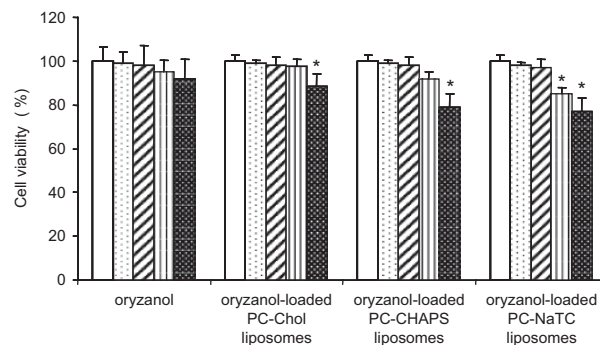


**Figure 3.** Percentage of viability of Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells after 16h incubation with pure  $\gamma$ -oryzanol and  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposome formulations at equivalent  $\gamma$ -oryzanol concentrations of control ( $\square$ ),  $H_2O_2$  ( $\blacksquare$ ), 0.01 ( $\text{▨}$ ), 0.1 ( $\text{▩}$ ), and 10 ( $\text{▤}$ )  $\mu\text{M}$  after 3 h of 125  $\mu\text{M}$   $H_2O_2$  inducing free radical. \*The mean difference is statistically different from  $H_2O_2$  ( $P$ -value  $< 0.05$ ).

0.01–10  $\mu\text{M}$ , whereas  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/Chol liposomes expressed antioxidant activity from 0.1–10  $\mu\text{M}$ . It can be seen that antioxidant activities did not increase after treatment with higher concentration of formulations. On the other hand, an incident of cell death at higher concentration of all formulations was observed, which could be related to cytotoxicity effect (Figure 4). Both  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes were shown to enhance the antioxidant activity in NHF cells compared to that of pure  $\gamma$ -oryzanol. This might due to the small particle size of liposome, including its bilayer structure that assists the cellular uptake and antioxidant activity enhancement.

#### Cell cytotoxicity

To investigate the cytotoxicity of gamma-oryzanol loaded liposomes, the cell viability was performed by MTT assay. The cytotoxicity of the free gamma-oryzanol, loaded liposome formulations at various concentration of gamma-oryzanol was examined in NHF cells. Cells without treatment of the dispersions were considered as a control with a cell viability of 100%. Low cytotoxicity of pure  $\gamma$ -oryzanol was found at all concentrations with more than 90% of cell viability. Figure 4 demonstrates an effect of liposome formulations on cell viability. Compared to pure  $\gamma$ -oryzanol,  $\gamma$ -oryzanol loaded liposomes resulted in a decrease in the % cell viability values as concentration of formulations increased.  $\gamma$ -oryzanol loaded PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes demonstrated dose-dependent cytotoxicity, while  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC/Chol liposomes demonstrated % cell viability values higher than 90% at all concentrations. The same trends of cytotoxicity were observed in bare-liposomes (PC/CHAPS liposomes, PC/NaTC liposomes and PC/Chol liposomes). A decrease in the % cell viability values at high concentration of PC/CHAPS liposomes and PC/NaTC liposomes formulations could be explained by a



**Figure 4.** Percentage of viability of Normal Human Foreskin fibroblast (NHF) cells after 48h incubation with pure  $\gamma$ -oryzanol and  $\gamma$ -oryzanol-loaded formulations at equivalent  $\gamma$ -oryzanol concentrations of control ( $\square$ ), 0.01 ( $\text{▨}$ ), 0.1 ( $\text{▩}$ ), 1 ( $\text{▧}$ ), and 10 ( $\text{▤}$ )  $\mu\text{M}$ . \*The mean difference is statistically different from control ( $P$ -value  $< 0.05$ ).

presence of free or bound surfactants. Cytotoxicity of bile acids has been reported against biliary epithelial cells.<sup>[25]</sup>

#### Conclusion

The liposomes can be produced by sonication method and the obtained particle sizes were in nano range. The decrease in particle sizes were observed in  $\gamma$ -oryzanol-loaded in formulations of PC-CHAPS and PC-NATC, suggesting the disintegration of vesicles or the transformation of some part of liposome to transient structure such as bilayer fragments and/or mixed micelles. The release rate of  $\gamma$ -oryzanol-loaded PC-Chol liposomes was higher than those of PC-CHAPS and PC-NATC. The antioxidant of  $\gamma$ -oryzanol-loaded liposomes was not different from pure  $\gamma$ -oryzanol, suggesting their potential for cosmetic purpose.

#### Acknowledgments

This work was supported by Commission of Higher Education (Thailand), The Thailand Research Fund (RSA 5280001), National Research Council of Thailand and Silpakorn University Research and Development Institute.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### References

1. Xu Z, Godber JS. Purification and identification of components of oryzanol in rice bran oil. *J Agric Food Chem* 1999;47:2724–2728.
2. Cicero AFG, Gaddi A. Rice bran oil and  $\gamma$ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinemias and other conditions. *Phytother Res* 2001;15:277–289.



3. Akihisa T, Yasukawa K, Yamaura M, Ukiya M, Kimura Y, Shimizu N, Arai N. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J Agric Food Chem* 2000;48:2313–2319.
4. Kim JS, Godber JS. Oxidative stability and vitamin E levels increased in restructured beef roast with added rice bran oil. *J Food Qual* 2001;24:17–26.
5. Nanua JN, McGregor JU, Godber JS. Influence of high-oryzanol rice bran oil on the oxidative stability of whole milk powder. *J Dairy Sci* 2000;83:2426–2431.
6. Xu Z, Hua N, Godber JS. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol components from rice bran against Cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *J Agric Food Chem* 2001;49:2077–2081.
7. Claudia J, Cossu M, Alamanni CA, Piu L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *Int J Pharm* 2005;299:146–154.
8. Coppini D, Paganizzi P, Santi P, Ghirardini A. Capacità protettiva nei confronti delle radiazioni solari di derivati di origine vegetale. *Cosmetic News* 2001;136:15–20.
9. Fahr A, van Hoogevest P, Kuntsche J, Leigh ML. Lipophilic drug transfer between liposomal and biological membranes: What does it mean for parenteral and oral drug delivery? *J Liposome Res* 2006;16:281–301.
10. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today* 2008;13:144–151.
11. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: An update review. *Curr Drug Deliv* 2007;4:297–305.
12. Mainardes RM, Urban MC, Cinto PO, Chaud MV, Evangelista RC, Gremião MP. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. *Curr Drug Deliv* 2006;3:275–285.
13. Vyas SP, Khatri K, Mishra V. Vesicular carrier constructs for topical immunization. *Expert Opin Drug Deliv* 2007;4:341–348.
14. Mezei M, Gulasekharan V. Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci* 1980;26:1473–1477.
15. Touitou E, Junginger HE, Weiner ND, Nagai T, Mezei M. Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery. *J Pharm Sci* 1994;83:1189–1203.
16. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *Int J Pharm* 2007;32:1–16.
17. Choli MJ, Maibach HI. Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems. *Int J Cosmet Sci* 2005;27:211–221.
18. Touitou E, Levi-Schaffer F, Dayan N, Alhaique F, Ricciardi F. Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: Liposomes versus permeation enhancers. *Int J Pharm* 1994;30:131–136.
19. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta* 1992;1104:226–232.
20. Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultra-deformable drug carriers, Transfersomes. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514:191–205.
21. Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, Jia L, Yin H, Chen C. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminodes* Ellis and *Crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chem* 2008;109:484–492.
22. Viriyaroj A, Kashiwagi H, Ueno M. Process of destruction of large unilamellar vesicles by a zwitterionic detergent, CHAPS: Partition behavior between membrane and water phases. *Chem Pharm Bull* 2005;53:1140–1146.
23. Viriyaroj A, Kashiwagi H, Ueno M. Solubilization of egg phosphatidylcholine liposomes by sodium taurocholate: Partition behavior and morphology. *Colloid Polym Sci* 2006;284:1131–1138.
24. Andrieux K, Forte L, Lesieur S, Paternostre M, Ollivon M, Grabielle-Madelmont C. Insertion and partition of sodium taurocholate into egg phosphatidylcholine vesicles. *Pharm Res* 2004;21:1505–1516.
25. Lamireau T, Zoltowska M, Levy E, Yousef I, Rosenbaum J, Tuchweber B, Desmoulière A. Effects of bile acids on biliary epithelial cells: Proliferation, cytotoxicity, and cytokine secretion. *Life Sci* 2003;72:1401–1411.

## **Fabrication of capsaicin loaded polyvinyl alcohol electrospun nanofibers**

Tanasait Ngawhirunpat <sup>a</sup>, Theerasak Rojanarata, Suwannee Panomsuk  
and Praneet Opanasopit

Pharmaceutical Development of Green Innovations Group, Faculty of Pharmacy, Silpakorn  
University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

<sup>a</sup> tanasait@su.ac.th

**Keywords:** Capsaicin, Electrospinning, Polyvinyl alcohol

### **Abstract**

The aim of this study was to prepare and characterize electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber mats loaded with capsaicin (CC) as a transdermal drug delivery system. The amount of CC loaded in the base PVA solution (10 %w/v solution) was 0.025, 0.0375 and 0.05 %, based on the dry weight of PVA (% wt). The average diameters of these fibers ranged from 121 to 165 nm. In all concentrations of CC loaded in spun PVA fiber mats, an amorphous nanodispersion of CC with PVA was obtained. The tensile strength of the as-spun fiber mats was lower than that of the as-cast PVA films. The release rate of CC from CC-loaded as-spun PVA was significantly higher than from CC-loaded as-cast PVA films, and increased when the CC content in both CC-loaded as-spun PVA and CC-loaded as-cast PVA films increased. Our research suggests a potential use for CC-loaded electrospun PVA mats as a transdermal drug delivery system.

### **Introduction**

The electrospinning process has recently attracted a great deal of attention due to its ability to produce ultrafine fibers with average diameters in the sub-micrometer to nanometer range.<sup>[1,2]</sup> These nanofibers exhibit several interesting characteristics, including a high surface area, mass to volume ratio and a small inter-fibrous pore size with high porosity, opening up vast possibilities for surface functionalization.<sup>[3-6]</sup> These advantages make electrospun polymeric fibers good candidates for a wide variety of applications such as tissue-engineered scaffolds, and drug delivery systems.<sup>[7-12]</sup> One of the obvious advantages of the electrospinning process over conventional film-casting techniques is the highly porous structure of electrospun fiber mats, which exhibit a much greater surface area that would potentially allow drug molecules to diffuse out from the matrix much more conveniently.

Capsaicin is the capsaicinoid compounds extracted from peppers and/or chilli. It uses for the temporary relief of minor aches and pains of muscles and joints associated with arthritis. The effect appears to be that the chemical mimics a burning sensation, the nerves are overwhelmed by the influx, and are unable to report pain for an extended period of time. Capsaicin is now available in the topical dosage form of creams, gels and dermal patches. However, very few data for the development of nanofiber mat of capsaicin is available in the literature. In the present study, mats of electrospun PVA nanofibers containing CC were fabricated. Morphology of neat and CC-loaded electrospun mats, tensile strength and strain at maximum, actual amount of CC within electrospun mats of neat and CC-loaded electrospun mats were investigated. Lastly, in vitro release studies of CC from drug-loaded spun mats and films were investigated.

### **Materials and Methods**

#### **Materials**

Polyvinyl alcohol (PVA; white powder; degree of polymerization  $\approx$  1600 and degree of hydrolysis  $\approx$  97.5 to 99.5 mol%) was supplied from Fluka (Switzerland). Capsaicin was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Sodium acetate (Ajax Chemicals, Australia), and glacial acetic acid (Carlo Erba, Italy) were of analytical reagent grade and used without further purification.

**Preparation of neat and CC-loaded PVA fiber mats and films**

A weighed amount of PVA powder was dissolved in distilled water at 80° C for 3 h to prepare a PVA solution at a fixed concentration of 10% w/v. After the solution was cooled down to room temperature (25° C), CC 0.025, 0.0375 and 0.05 % wt, based on the dry weight of PVA (% wt)) was added into the PVA solution under constant stirring for 4 h. Prior to electrospinning, the as-prepared solutions were measured for their viscosities and conductivities using a Brookfield DV-III programmable viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, USA) and an Orion 160 conductivity meter (Orion Research Incorporated, USA), respectively. Electrospinning of the as-prepared solutions was carried out by connecting the emitting electrode of positive polarity from a Gamma High-Voltage Research ES30PN/M692 high voltage DC power supply to the solutions contained in a standard 50-ml syringe, the open end of which was attached to a blunt gauge-20 stainless steel needle (outer diameter = 0.91 mm), used as the nozzle, and the grounding electrode to a home-made rotating metal drum (outer diameter = 9 cm), used as the fiber-collection device. A fixed electrical potential of 15 kV was applied across a fixed distance of 15 cm between the tip of the nozzle and the outer surface of the drum (i.e., the electrostatic field strength of 15 kV/15 cm). The rotational speed of the rotating drum was 50-60 rpm. The feed rate of the solutions was controlled to about 1 ml h<sup>-1</sup> by means of a syringe pump. The CC-loaded PVA films were prepared by solution-casting technique from a PVA solution having a concentration of 10% w/v and CC (0.025, 0.0375 and 0.05 % wt). The thickness of both the electrospun mats (for the mats that were electrospun for about 24 h) and the as-cast films was controlled between 20 and 30 µm.

**Morphology study**

The morphological appearance of both the neat and the CC-loaded as-spun PVA fiber mats was observed by a JEOL JSM-5200 scanning electron microscope (SEM), JEOL, Japan. Each of the fiber mat samples was sputtered with a thin layer of gold prior to SEM observation. Based on these SEM images, the average diameter of the PVA electrospun mats was measured and reported as average values from at least 100 measurements.

**Mechanical integrity study**

The mechanical integrity in terms of the tensile strength and the strain at maximum of both the neat and the CC-loaded as-spun PVA fiber mats (0.025, 0.0375 and 0.05 % wt) was investigated using a Lloyd LRX universal testing machine at room temperature (25° C) conditions. Each specimen was cut into a rectangular shape (10 mm x 100 mm). The crosshead speed and the gauge length were 20 mm min<sup>-1</sup> and 50 mm, respectively. The results were reported as average values (n = 10).

**Actual drug content analysis**

The actual amount of drug in the CC-loaded as-spun PVA fiber mats and as-cast PVA films (cut into circular discs of ~1.5 cm in diameter) was quantified by dissolving each sample in 4 ml of dimethylsulfoxide (DMSO). After that, 0.5 ml of the solution was pipetted and added into 8 ml of acetate buffer solution. CC-containing dilute solution was measured for the drug amount using a spectrophotometer (Perkin Elmer, USA). The amount of drug originally present in the as-spun PVA mats and the as-cast PVA films was then back-calculated from the obtained data against a predetermined calibration curve. The results are reported as averages from at least five measurements.

**In vitro release of CC from CC-loaded PVA fiber mats and films**

The in vitro release experiments were performed using a Franz diffusion cell (MatTek Corporation, USA). The cellulose acetate membrane was mounted between the donor and receptor phases of the Franz diffusion cell. The temperature of the receptor solution was maintained at 32° C using a water jacket connected to a water bath. The receptor phase has 4.0 ml volume and 1.28 cm<sup>2</sup> effective diffusion area. Each of the dry CC-loaded as-spun fiber mat or as-cast film samples (cut into circular discs of ~1.5 cm in diameter) was placed on cellulose acetate membrane, which, in turn was placed on top of an acetate buffer solution on the Franz diffusion cell. In vitro release was run for 2 h. A part (0.3 ml) of receiver solution was withdrawn and replaced with the same volume of acetate buffer solution to keep the volume constant. The amount of CC in the sample solution was determined using spectrofluorometer (Perkin Elmer, USA). These data were carefully calculated to determine the cumulative released of CC from CC-loaded PVA fiber mats and films

### Statistical analysis

All results were expressed as mean  $\pm$  S.D. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD post hoc test. Differences of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### Results and Discussion

#### Morphology of neat and CC-loaded PVA fiber mats

The as-prepared 10% w/v PVA solution in distilled water was electrospun under an electrostatic field strength of 15 kV/15 cm. A selected SEM image of the obtained fibers (CC loaded PVA electrospun nanofibers 0.05%) is shown in Figure 1. Cross-sectional round fibers with a smooth surface were obtained. The average diameter of these fibers ( $n = 100$ ) was  $165 \pm 11$  nm. Due to the smoothness of the resulting fibers, the 10% w/v PVA solution was used as the base solution into which various amounts of CC were added. The SEM images of the CC-loaded as-spun PVA fibers revealed no presence of the drug crystals or other kinds of drug aggregates on the surface of the fibers. This implies that the drug was molecular dispersed within the electrospun fiber.

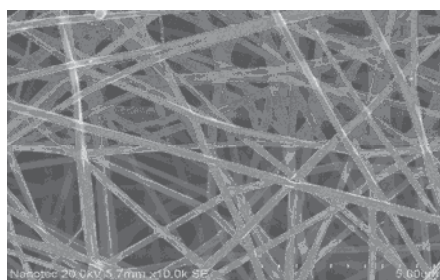


Figure 1 Scanning electron micrographs (5000 x) of as-spun PVA fiber mats from 10% w/v PVA solutions loaded with CC at 0.05% by weight of PVA. The electrostatic field strength was 17.5 kV/15 cm and the collection time was 5 min.

#### Tensile properties of neat and CC-loaded PVA fiber mats and films

In terms of the tensile strength and the strain at maximum, the mechanical integrity of the neat and the CC-loaded as-spun PVA fiber mats and as-cast PVA films were investigated. The thicknesses of these fiber mats and films ranged from 20 to 30  $\mu\text{m}$ . The tensile strength for all the as-spun fiber mats was in the average value being 16.5 MPa, while the tensile strength for all of the as-cast films was in the average value being 20.7 MPa. The much greater tensile strength of the as-cast films compared to that of the as-spun fiber mats was also reflected in the observed lower strain at maximum of the films compared to the fiber mats. Specifically, the strain at maximum for all the as-cast films was in the average value being 3.5%, while the values for all of the as-spun fiber mats were in the average value being 16.2%. The presence of CC in the various concentrations tested did not affect the tensile properties of both the as-spun PVA fiber mats and the as-cast PVA films. The as-cast films showed slightly greater tensile strength than the as-spun fiber mats, while the strain at maximum of the as-spun fiber mats was about 5 times greater than that of the as-cast films. This finding suggests that if the CC-loaded as-spun fiber mats are to be developed as transdermal patches, there is an advantage over the corresponding as-cast films with dramatic improvement in the flexibility of the obtained patches.

#### Actual CC content in CC-loaded PVA fiber mats and films

The actual amount of the drug incorporated into the CC-loaded as-spun PVA fiber mats and as-cast PVA films was determined prior to investigating their skin permeation characteristics. The actual amounts of CC in the CC-loaded as-spun fiber mat and as-cast film samples were determined to be about 80.2-85.5 % and  $\sim$ 89.9-95.7%, respectively. Additionally, due to the smoothness of the surface of the CC-loaded as-spun PVA fibers (Figure 1), it is postulated that CC was also encapsulated within the fibers.



### In vitro release of CC from CC-loaded PVA fiber mats and films

The release of the drug from the CC-loaded as-spun PVA fiber mats and as-cast PVA films were determined. Fig. 2 shows the release profiles of CC. The percentage of CC release shows a good linear correlation with the square root of time. These results indicate that the drug in donor system is dissolved and a concentration gradient exists. The equation 1 used to describe the release of CC.

$$M_t = kt^{1/2} \quad (1)$$

where  $M_t$  is the amount of drug released at a given time,  $k$  is release rate. Eq. 1 could be used for elucidating the release kinetics of the CC from as-spun PVA fiber mats and as-cast PVA films.

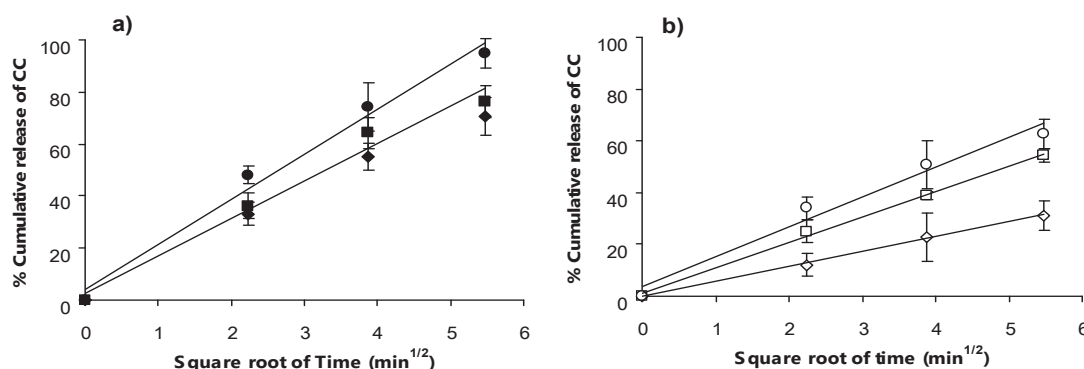


Figure 2 Release profile of CC permeated from (a) CC-loaded electrospun mats at (♦) 0.025 %, (■) 0.0375%, and (●) 0.05% by weight of PVA and (b) CC-loaded as-cast PVA films at (◇) 0.025 %, (□) 0.0375%, and (○) 0.05% by weight of PVA (open symbol) . Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of three to four experiments.

The cumulative amount of CC release of the CC-loaded as-PVA electrospun (at 2 h) was about 69, 79, and 93% for the mats loaded with 0.025, 0.0375 and 0.05% wt of CC, respectively; the amount that CC released from the CC-loaded as-cast PVA films (at 2 h) was about about 33, 51, and 60% for the the PVA films loaded with 0.025, 0.0375 and 0.05% wt of CC, respectively. The release rate for CC-loaded as-spun PVA film for 0.025, 0.0375 and 0.05% wt of CC was 5.25, 8.86, and 11.2 % min<sup>-1/2</sup>, whereas the release rate for CC-loaded as-spun PVA electrospun samples for 0.025, 0.0375 and 0.05% wt of CC was 13.5, 14.3, and 17.3 % min<sup>-1/2</sup>. These results might be due to the high surface area of electrospun comparing with the film. An increase in the CC content in the polymer matrix provided a reduction of the relative amount of polymer as a diffusion barrier, which resulted in increased CC release.

### Conclusions

Capsaicin(CC)-loaded electrospun nanofibers were successfully performed through electrospinning. The as-spun fibers had average diameters ranging between 121 to 165 nm. The release rate of the CC permeated from CC-loaded as-spun PVA was significantly higher than from CC-loaded as-cast PVA films, and increased when the CC content in both the CC-loaded as-spun PVA and CC-loaded as-cast PVA films was increased. These results suggest a possibility for utilizing CC-loaded electrospun PVA mats as transdermal therapeutic agents.

### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support from Silpakorn University Research and Development Institute (SURDI 54/01/25) and the Thailand Research Funds (RSA 5280001).

### References

- [1] N. Bhardwaj and S. C. Kundu: *Biotechnology Advances* Vol. 28 (2010), p. 325
- [2] T. J. Sill and H. A. V. Recum: *Biomaterials* Vol. 29 (2008), p. 1989
- [3] N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat and P. Supaphol: *Carbohydrate Polymers* Vol. 81 (2010), p. 675
- [4] Y. T. Jia, J. Gong, X. H. Gu, H. Y. Kim, J. Dong and X. Y. Shen: *Carbohydrate Polymers* Vol. 67 (2007), p. 403

## **Product Design and Manufacturing**

10.4028/www.scientific.net/AMR.338

## **Fabrication of Capsaicin Loaded Polyvinyl Alcohol Electrospun Nanofibers**

10.4028/www.scientific.net/AMR.338.42

## A Hollow Microneedle Carrier for Enhancing Skin Penetration of Large Molecular Compounds

Nanthida Wonglertnirant<sup>1,a</sup>, Tanasait Ngawhirunpat<sup>1,b</sup>, Praneet Opanasopit<sup>1,c</sup>, Hiroaki Todo<sup>2,d</sup> and Kenji Sugibayashi<sup>2,e</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

<sup>2</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

<sup>a</sup> w.nanthida@gmail.com, <sup>b</sup> tanasait@su.ac.th, <sup>c</sup> praneet@su.ac.th,

<sup>d</sup> ht-todo@josai.ac.jp, <sup>e</sup> sugib@josai.ac.jp

**Keywords:** Hollow Microneedle; Drug Release; Injection; Transdermal Delivery; Large Molecular Compound

**Abstract.** Delivery of drugs through skin is obstructed by the excellent barrier properties of the outermost skin layer, the stratum corneum (SC). A strategy employing microneedles have recently emerged as a minimally invasive device for disrupting the SC structure and creating holes for molecules to pass through. Hollow-typed microneedles permit drug delivery which can be modulated over time via active delivery controlled by hand or pump. In this study, the potential of hollow microneedle for overcoming the outermost skin barrier and facilitating drug delivery into skin was investigated. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans (4.3 kDa), FD-4, was used as a model large molecular compound. The effects of injection volume and formulation on drug release behavior from skin were determined. FD-4 was favorably loaded into the lower epidermis as well as the superficial dermis of the skin by a hollow microneedle. The release profiles of FD-4 were analyzed by Higuchi model based on Fick's law of diffusion. The higher the volume of FD-4 solution injected, the faster the FD-4 release rate from skin. Liposome formulation exhibited no difference on drug release profiles compared with the solution. The results provide information for designing an effective hollow microneedles system.

### Introduction

Skin is a large and logical target for drug delivery, however, its basic functions limit its utility for this purpose. Only a limited number of drugs (essentially the small molecular weight drugs and lipophilic molecules) can cross the skin at therapeutic rates by means of the conventional transdermal patches with little or no enhancement [1]. Many strategies, including chemical enhancers and physical enhancer techniques such as iontophoresis, electroporation, and microneedles, have been developed to enhance the skin permeability. Microneedles have been recently gained much interest. Since they are minimally invasive devices and can effectively and painlessly deliver a variety of compounds [2], especially for the macromolecules across the skin [3]. The concept employs an array of microscopic needles that are sufficiently large to deliver drug effectively, but small enough to avoid causing pain [4]. Hollow-typed microneedles exhibit the advantage over the solid ones because they can be used to deliver the therapeutic drugs across the skin by a single step via a passive or an active delivery controlled by hand or pump [4]. Microinjection from hollow microneedle arrays contributes the push pressure to propel the drug toward the skin. The enhanced and rapid macromolecular delivery could be achieved. To determine the optimum design of hollow microneedles system, information on the effect of several factors must be considered, for instance, various needle parameters including injection conditions (e.g. length of microneedle/ injection depth, needle numbers, distance between each needle, pressure of injection, etc.), physicochemical properties of drugs (e.g. molecular weight, lipophilicity, etc.), and formulations.

The objective of this study was to evaluate the influence of variables related to the hollow microneedle system on *in vitro* drug release behavior of hydrophilic large molecular compound from skin. FD-4 was used as a model compound. A single 33-gauge hypodermic needle was used to represent the hollow microneedle array in order to reduce the effect of needle parameters. The effects of injection volume and formulation on *in vitro* drug release from skin were assessed.

## Experimental methods

**Chemicals and animals** Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (FD-4; average molecular weight, 4.3 kDa) was obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was supplied by NOF Co., Ltd. (Tokyo, Japan). All other chemicals were of analytical grade and used without further purification. A hollow microneedle, manufactured from a 33-gauge hypodermic needle (i.d., 0.20 mm) connected to a 27-gauge hypodermic needle (i.d., 0.22 mm; o.d., 0.40 mm), was kindly provided by Terumo Co. (Tokyo, Japan). Male hairless rats (WBM/ILA-Ht, 7–9 weeks-old, body weight: 180–250 g) were supplied either by Life Science Research Center, Josai University (Sakado, Saitama, Japan) or Ishikawa Experimental Animal Laboratories (Fukaya, Saitama, Japan). All animal experiments were conducted under the guidelines of Josai University.

**Histological imaging.** To observe the penetration of hollow microneedle into skin and the pathway of fluid injection, a small amount of Evans blue dye was injected into skin by a hollow microneedle. After removing the microneedle, the skin sample was frozen in isopentane (2-methylbutane) cooled by dry ice with an optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA, U.S.A.) in an embedding mold container. A freezing microtome (Leica CM3050S; Finetek, Japan) was used to make the vertical sections of 10  $\mu\text{m}$  thickness. These sections were examined histologically using a phase-contrast microscope (IX71; Olympus, Japan).

***In vitro* skin release studies.** The upper part of full-thickness skin from the dorsal region of hairless rats was used as the model membrane for skin release study. The thickness of excised skin was about 1.0–1.3 mm. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (FD-4) was used as a model high molecular weight hydrophilic compound. The effects of injection volume and formulation on the extent and rate of FD-4 release from skin injection site were investigated as follows; (1) Different volumes of FD-4 solution (5, 10, or 20  $\mu\text{l}$ ) were administered into the excised dorsal skin by single injection; (2) Different drug formulations (solution and liposome suspension) at 10  $\mu\text{l}$  were injected into excised skin by single injection. The skin was mounted on a Franz-type diffusion cell with a water jacket connected to a thermo-regulated water bath at 32°C, each having 6.0 ml volume and 1.77  $\text{cm}^2$  effective diffusion area. The SC side of skin faced up to the donor compartment. The receiver compartment was filled with pH 7.4 phosphate-buffered saline (PBS) and stirred on a magnetic stirrer with a bar. The experiment was performed at 32°C for 8 h. A part (0.5 ml) of receiver solution was withdrawn and replaced with the same volume of pH 7.4 PBS to keep the volume constant. The concentration of FD-4 in all samples was assayed by spectrofluorophotometer (RF 5300PC; Shimadzu, Kyoto, Japan) at the excitation wavelength of 495 nm and emission wavelength of 515 nm. After the release study was ended over 8 h, the amount of drug remaining in the skin was determined by separating the skin from the diffusion cell. The skin was cut into small pieces with scissors and fine forceps, and homogenized (at 12,000 rpm for 5 min) with 2 ml PBS to extract the FD-4 under an ice bath. Acetonitrile (2ml) was then added and blended with skin homogenized solution using a vortex shaker to precipitate protein. After centrifugation at 15,000 rpm for 5 min, the clear supernatant was taken for analysis. The obtained value was used to calculate the percentage of drug release from skin.

**Formulations for injection.** Solution and liposome suspension were considered to examine the effect of formulations on the drug release behavior from skin after injection by a hollow microneedle. (1) FD-4 (1 mM) solution was prepared by adding to pH 7.4 PBS; (2) Liposome-based formulation was prepared by the reverse phase evaporation method [5]. Briefly, the lipid phase (DMPC) was dissolved in a mixture of chloroform and isopropyl ether (1:1, v/v), and then mixed with the aqueous solution containing 1 mM FD-4 in a sonication bath for 5 min to obtain a



water-in-oil emulsion. The organic solvent was evaporated using the rotary evaporator. The liposomes finally became an aqueous suspension. The freeze-thaw cycle was performed and repeated three times. The liposome suspension was then extruded through polycarbonate membranes with pore sizes of 0.4  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\mu\text{m}$ , and 0.1  $\mu\text{m}$ , respectively. The extrusion process was run 5 times per membrane pore size. Liposomes were separated from non-encapsulated FD-4 by ultracentrifugation at 289,000  $\times g$  for 10 min and the vesicles were resuspended in PBS for four cycles. The entrapment efficiency of FD-4 in liposomes was 2.19%. Size distribution was determined by dynamic light scattering (Malvern Instruments, Southborough, MA, U.S.A.) and revealed a mean vesicle diameter of 106.3 nm.

**Data analysis.** The cumulative amount of FD-4 released through a unit area of skin,  $Q$ , was plotted against the square root of time,  $t^{1/2}$ . The FD-4 release rate can be determined from the slope of the graphic plot in accordance with the simplified Higuchi model [6] as follows;

$$Q = kt^{1/2} \quad (1)$$

where  $k$  is the kinetic constant indicative of the release rate. Higuchi describes drug release as a diffusion process based on the Fick's law, square root time dependent. Eq. (1) is confined to the description of the first 30% of the release curve.

## Results and discussion

**Characterization of hollow microneedle injection.** To investigate piercing of the skin barrier and delivering the drug across the skin by a hollow microneedle, the small amount of Evans blue dye was injected into the excised back skin of hairless rats. The needle was fixed with a triangular silicone sheet to maintain an angle of insertion ( $\theta$ ) of  $40^\circ$  and constant insertion depth in the skin barrier, as illustrated in Fig. 1A. No bending of the needle tip was observed after removing the needle. A histological study was performed by examining skin sections under a light microscope. Fig. 1B shows a typical cross section of a skin piece. The blue dye in the skin corresponded to the needle insertion across the SC and epidermis as well as into the superficial dermis.

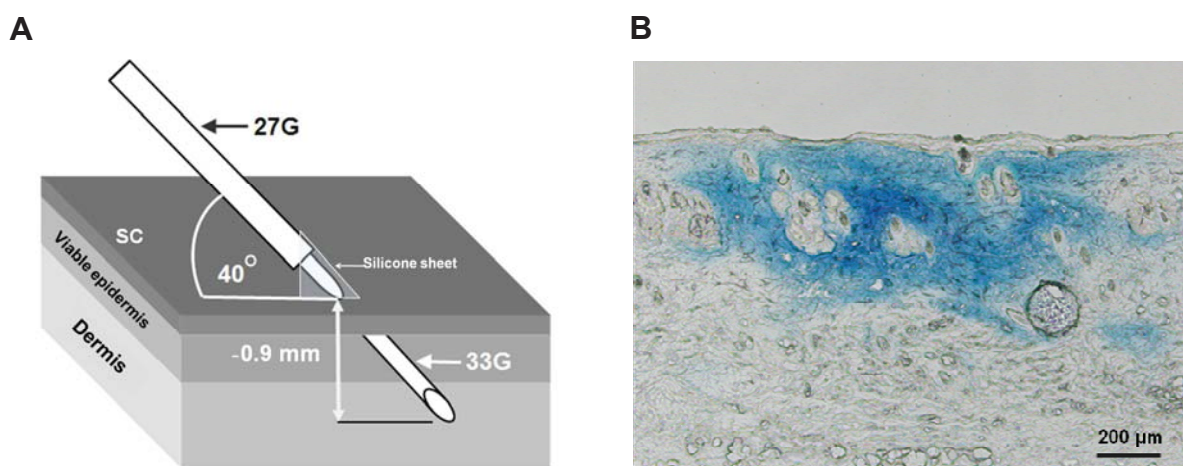


Fig. 1. Schematic representation of hollow microneedle piercing into skin with a 33-gauge hypodermic needle (A) and histological cross section of the excised skin from hairless rat pierced with a hollow microneedle *in vitro* (B). A small amount of Evans blue was injected into skin. The paths of fluid injection are indicated by the presence of blue dye.

**Effects of injection volume on the release behavior of FD-4 from skin** To evaluate the effect of the injection volume, 5, 10 and 20  $\mu\text{l}$  FD-4 solution were loaded into the skin using a hollow microneedle. Up to 20  $\mu\text{l}$  (bolus injection) of FD-4 solution was successfully injected into skin without any leakage from the skin surface or from the bottom (dermal) side of the skin. The

deposition of FD-4 solution in skin was visualized by the appearance of a greenish-yellow region spread around the injection site (Fig. 2). FD-4 solution was released approximately 80% from the skin over 8 h in all cases (data not shown). Fig. 3 shows the graphic plot of the cumulative amounts of FD-4 released per unit area from skin against the square root of time. Linear relationships ( $R^2 = 0.974$ -0.998) were obtained. These results demonstrated that the release of FD-4 followed the Higuchi diffusion model validated when drug release was less than 30%. The drug release rate ( $k$ ) can be calculated from the slope of the graphic plot. It was shown that higher volume injection (from 5 to 20  $\mu\text{l}$ ) increased the release rate almost proportionally (Fig. 3).

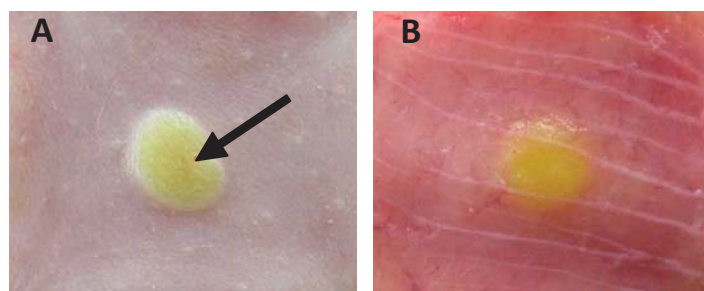


Fig. 2. Photographs of the excised hairless rat back skin after injection of 20  $\mu\text{l}$  of FD-4 solution using a hollow microneedle: (A) top surface, (B) bottom surface. The black arrow in (A) indicates the needle insertion site. The greenish-yellow regions represent FD-4 localization within skin.

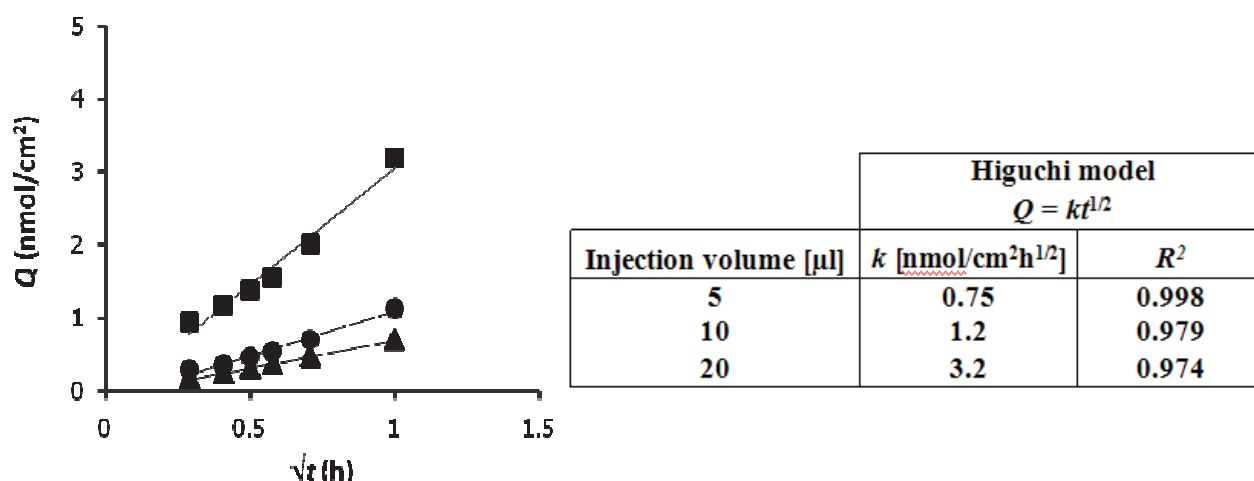


Fig. 3. Analysis of the effect of injection volume on the FD-4 release profile using the simplified Higuchi model. Symbols:  $\blacktriangle$ , 5  $\mu\text{l}$ ;  $\bullet$ , 10  $\mu\text{l}$ ;  $\blacksquare$ , 20  $\mu\text{l}$ . The table expresses the release kinetics derived from the graphic plots.

**Effect of different formulations on the release profile of FD-4 from skin.** The feasibility of formulation for modulating drug release after loading into skin by a hollow microneedle was studied. For this purpose, solution and liposome suspension were investigated. Fig. 4 shows the FD-4 release profiles of two different formulations after delivery using a hollow microneedle. The release profile of FD-4 from the liposome-based formulation over 8 h was not different from that of the solution. The implication of these results may explain by the low entrapment efficiency of FD-4 in liposome. FD-4 was highly solubilized and mostly presented in the buffer vehicle outside the lipid vesicle structures, therefore resulting in the same release profile as of the solution.

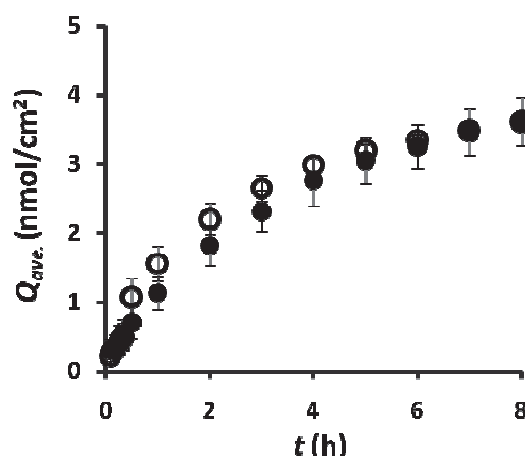


Fig. 4. Effect of formulation on the release profile of FD-4 from skin. Symbols: ●, solution; ○, liposome suspension. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of four to six experiments.

## Conclusion

The present study demonstrated the utilization of hollow microneedle for facilitating macromolecular drug delivery into skin. A single 33-gauge hypodermic needle was used to represent the hollow microneedle array and insert into skin with an angle of 40 degree. The device could avoid the SC barrier and successfully load drug into skin. The advantage of single needle device is capable to investigate several factors such as administration volume, needle penetration depth, and pressure of injection. Injection volume was one of the factors which can be utilized to control the drug migration rate from the injection site. Further studies need to be performed for obtaining additional details to develop the effective and controllable hollow microneedle system.

## Acknowledgements

This research was financially supported by the Commission of Higher Education and the Thailand Research Funds through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0104/2549) and Grant No. RSA 5280001.

## References

- [1] M.R. Prausnitz and R. Langer: Nat. Biotechnol. Vol. 26, 11 (2008), p. 1261-8.
- [2] M.R. Prausnitz: Adv. Drug Deliv. Rev. Vol. 56, 5 (2004), p. 581-7.
- [3] X.M. Wu, H. Todo and K. Sugibayashi: Int. J. Pharm. Vol. 316, 1-2 (2006), p. 102-8.
- [4] M.R. Prausnitz, J.A. Mikszta and J. Raeder-Devens, in: Percutaneous Penetration Enhancers, edited by E.W. Smith and H.I. Maibach, Taylor & Francis Group., NW (2006), p. 239-56.
- [5] F.Jr. Szoka and D. Papahadjopoulos: Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 75 (1978), p. 4194-98.
- [6] P. Costa and J.M. Sousa Lobo: Eur. J. Pharm. Sci. Vol. 13 (2001), p. 123-33.

## Formulation and Evaluation of Isosorbide Dinitrate Acrylic Matrix Transdermal Patches

Ponwanit Jarenputtakrun <sup>a</sup>, Praneet Opanasopit <sup>b</sup>, Suwannee Panomsuk <sup>c</sup>  
and Tanasait Ngawhirunpat <sup>d</sup>

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathon 73000, Thailand

\*Corresponding author: tanasait@su.ac.th

<sup>a</sup>gingging1986@hotmail.com, <sup>b</sup>praneet@su.ac.th, <sup>c</sup>swan@su.ac.th, <sup>d</sup>tanasait@su.ac.th

**Keywords:** Isosorbide Dinitrate, Skin Permeation, Transdermal Drug Delivery Systems

**Abstract.** The aim of this study was to prepare and investigate the isosorbide dinitrate transdermal patches (IDPs) in the concentration of 40 mg/cm<sup>2</sup>. Acrylic pressure sensitive adhesives (PSA) were used to formulate IDPs. IDPs were prepared by casting method. The effect of content of PSA, and concentration of enhancer, propylene glycol, in the formulations were evaluated. IDPs were investigated for their thickness, weight/area ratio, adhesiveness and *in vitro* skin permeation. The higher the content of PSA in the formulation, the higher the thickness and the W/A ratio. Propylene glycol added in the formulation (2.5, 5, 10%) significantly enhanced the skin permeation of ISDN. The higher the content of PG, the higher the flux of ISDN through the skin. Our research suggests that isosorbide dinitrate loaded with 10% of propylene glycol in acrylic matrix pressure sensitive adhesive can be potentially used as a transdermal drug delivery system.

### Introduction

All patch-type transdermal delivery system developed to date can be described by three basic design principles: drug in adhesive, drug in matrix (usually polymeric), and drug in reservoir. However, the simplest form of transdermal drug delivery device, which is now most commonly employed and interested, is the drug in adhesive system due to its simplicity of preparation and the lack of dose dumping which can be taken place when the drug in reservoir was employed [1,2]. Isosorbide dinitrate patches (IDPs) are used for angina pectoris treatment. Two types of IDPs, drug in adhesive and drug in matrix, were studied by various investigators. Polyacrylate adhesive polymers are most widely used as an adhesive film for fabricating TDDS, especially for lipophilic drugs such as isosorbide dinitrate, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In vitro evaluations of TDDS typically include drug release from the device and drug permeation through the skin. In vitro release is used as quality control test to characterize the TDDS and is applied to assure batch-to-batch uniformity and to support scale-up in the industrial preparation. On the other hand, in vitro skin permeation is used to investigate the rate and amount of the drug permeation across the skin. However, physicochemical evaluation of TDDS such as thickness, W/A ratio of matrix, adhesiveness should be simultaneously studied and compared with in vitro evaluation [3]. In this research, we studied the physicochemical property and in vitro evaluation of isosorbide dinitrate transdermal patch using acrylic pressure sensitive adhesive as polymer matrix. The formulation factors such as content of polymer and type of enhancers on skin permeation of drug were investigated.

### Materials and methods

**Materials.** Acrylic pressure-sensitive adhesive (Acrylax® ER-7306), siliconized paper and polyolefin backing membrane were a gift from Neoplast Co., Ltd., Patumthani, Thailand. Isosorbide dinitrate (ISDN) was purchased from Sigma (St. Louise, MO, USA). Other reagents were all analytical grade and used as received.

**Preparation of IDPs.** The composition of formulations of IDPs was shown in Table 1. The preparation area was 40 cm<sup>2</sup>, and the content of the drug in the matrix was 1 mg/cm<sup>2</sup>. For each preparation, isosorbide dinitrate and enhancers were dispersed and evenly mixed with acrylic PSA (solid content 45 %w/w) in a glass tube. The mixture was poured on a sheet (12 x 12 cm) of polyolefin backing membrane that had been fixed onto a clean glass plate. The thickness of IDPs was controlled by a Thin-layer chromatography (TLC) plate scraper (Camag, Switzerland). The film was dried at 60 °C for 2 h and then was covered with siliconized release liner.

Table 1 Composition of IDPs in preparation area of 40 cm<sup>2</sup>

Composition(g)	F1	F2	F3	F4	F5
ISDN	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Acrylic PSA	9	19	9	9	9
Propylene glycol	-	-	0.105	0.209	0.418

**Determination of isosorbide dinitrate content.** A sample of 1 cm x 1 cm of the patch was dissolved in 100 ml of phosphate buffer solution and magnetically stirred for 48 h. The solution was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

**Thickness of IDPs.** The thickness of the patch was measured using an electronic digital caliper. The thickness of the adhesive matrix was determined from the difference in thickness between the patch and the backing membrane plus with siliconized release liner.

**The weight/area ratio of IDPs.** The patch (1 cm x 1 cm) was cut and weighed accurately. The difference in weights between isosorbide dinitrate patch and the backing membrane when divided by area provided W/A ratio of matrix film.

**Adhesiveness of IDPs.** The adhesive property was measured by Texture Analyzer. The formulation patch (1 cm x 1 cm) was compressed by rounded spherical ball probe. The force was applied to pull out the spherical ball probe from the formulation patch. The obtained force was plotted against the time, and the area under curve of this plot showed the adhesiveness of the patch (N.sec).

**In vitro skin permeation studies of IDPs.** Shed snake skin of *Naja khaothia* [4] was kindly donated by the Saowabha Institute (Bangkok, Thailand). A modified Franz-diffusion cell was used. Each of the cells was stationed in a cell-mounting block (Franz 6-cell drive consol, Crown Glass Company, Somerville, NJ). The shed snake skin was mounted between donor and receptor compartment. The isosorbide dinitrate adhesive matrix was fixed on the epidermal surface, donor and receptor compartments were clamped together and placed in a water bath maintained at 37±0.5°C. The volume of receptor cell was 15 ml and the effective surface area available for skin permeation was 12.6 cm<sup>2</sup>. The receptor cell was filled with pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS) and stirred at 600 rpm with a star-head Teflon<sup>®</sup> magnetic bar (Nalge Nunc International Co., Ltd., Minnesota, USA) driven by a synchronous motor. At predetermined time intervals, 0.8 mL of sample was taken from the receptor compartment and was replaced by the same volume of fresh PBS. All experiments were carried out at least in triplicate. The skin permeation of commercial product of isosorbide dinitrate from Japan was also evaluated and compared.

**Analysis of isosorbide dinitrate.** Isosorbide dinitrate concentration was assayed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The reverse-phase HPLC system consisted of an Agilent HPLC system (Agilent 1100 series, USA) at a flow rate of 1.0 ml/min at 35°C. A mobile phase of acetonitrile: water (55:45) were used. The internal standard was ethyl paraben. The detection wavelength was set at 220 nm. The detection limit of the analysis was 1 µg/ml.

## Results and discussion

**Characteristics of IDPs.** All preparations of IDPs were colorless, transparent without any air bubbles, and their surfaces were smooth. The thickness and W/A ratio of the nicotine adhesive matrix films demonstrated low standard deviation, indicating a good reproducibility in the



production of IDPs. ISDN recovery from the IDPs was in the range of 99-102 %. This result indicated that isosorbide dinitrate is stable during the preparation process. The thickness of IDPs was in the range of 71-98, the W/A ratio was 45-99 and the adhesiveness was 0.433-0.468. It was found that the higher the content of PSA, the higher the thickness and the W/A ratio. However, the adhesiveness was not affected by the content of PSA and propylene glycol in the formulation. The physicochemical properties of isosorbide dinitrate patches is shown in table 2.

Table 2 The physicochemical properties of isosorbide dinitrate patches\*

Formulation	% of initial amount (%±SD)	Thickness ( $\mu\text{m}$ ±SD)	W/A ratio ( $\text{g}/\text{m}^2$ ±SD)	Adhesiveness (N.sec± SD)
F1	$99 \pm 1.5$	$71 \pm 2.3$	$45 \pm 2.1$	$0.468 \pm 0.15$
F2	$99 \pm 1.5$	$98 \pm 2.5$	$99 \pm 2.2$	$0.462 \pm 0.10$
F3	$101 \pm 1.4$	$73 \pm 2.6$	$47 \pm 2.3$	$0.461 \pm 0.08$
F4	$101 \pm 2.4$	$72 \pm 3.9$	$46 \pm 2.1$	$0.456 \pm 0.23$
F5	$102 \pm 2.5$	$74 \pm 3.5$	$45 \pm 2.2$	$0.433 \pm 0.18$

\*Each value represents the mean  $\pm$  SD. (n=3-6)

**In vitro skin permeation characteristic of IDPs.** The *in vitro* skin permeation of IDPs in each formulation and commercial product is illustrated in Figure 1. The cumulative amount of drug increased with time after a short lag time (0.5-0.8 h). Figure 2 shows the flux of ISDN, calculated from the slope of skin permeation profile in each formulation. The flux of ISDN in F2 was slightly higher than that of F1. This might be due to the higher content of PSA in F2, resulting in lower release of drug and consequently lower skin permeation. Therefore, F1 was used for incorporation of propylene glycol for study effect of penetration enhancer on the skin permeation of ISDN. The flux of drug permeated through the skin in the formulation with propylene glycol (F3-F5) was significantly higher than the formulation without any propylene glycol. The higher the content of PG, the higher the skin permeation of ISDN through the skin. F5, containing 10% PG gave the highest skin permeation. Unexpectedly, the higher flux in F5 than commercial product was also observed. In the literatures, propylene could increase the skin permeation by interaction with the stratum corneum lipids at the head group of lipid bilayer, then the lipid bilayer packing was disrupted. Moreover, propylene glycol increased the permeation by increasing the partitioning of drug into the stratum corneum [1]. Many studies reported the enhancing activity of propylene glycol on the skin permeation, such as tamoxifen, diclofenac sodium, insulin, nicardipine, carbamazepine [4-6]. In this study, propylene glycol also showed enhancing activity. Therefore, in preparation of isosorbide dinitrate patch, propylene glycol can be used to be an effective enhancers added in the formulation.

## Summary

The isosorbide dinitrate acrylic matrix transdermal drug delivery system was successfully prepared by casting method. Propylene glycol added in the formulation significantly enhanced the skin permeation of ISDN. The higher the content of PG, the higher the flux of ISDN through the skin. Our research suggests that ISDN patch with propylene glycol 10% can be potentially used as a transdermal drug delivery system.

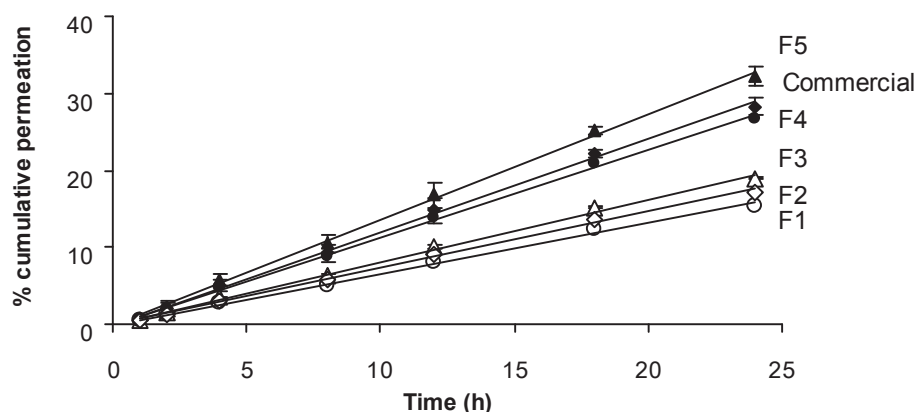


Figure 1. *In vitro* skin permeation profile of isosorbide dinitrate transdermal delivery through shed snake skin. Each value represents the mean  $\pm$  SD. (n=3-6)

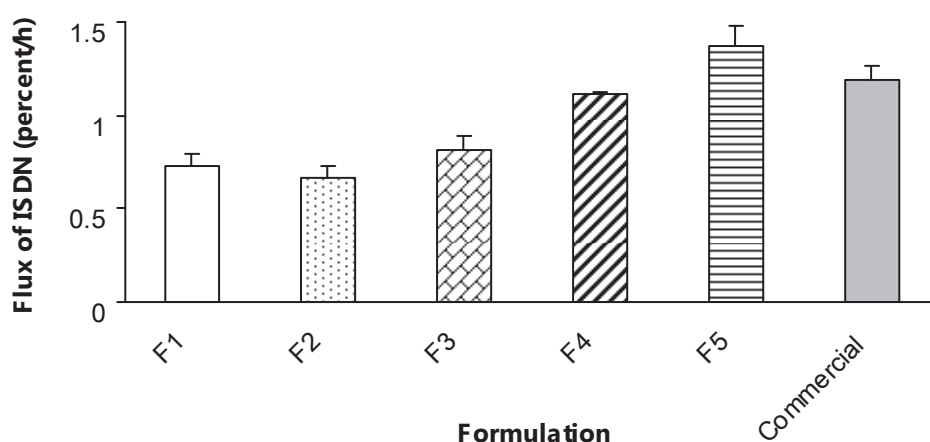


Figure 2. Flux of isosorbide dinitrate transdermal delivery through shed snake skin. Each value represents the mean  $\pm$  SD. (n=3-6)

### Acknowledgements

This work was financially supported by the Thailand Research Funds through the Research Career Development Grant (RSA 5280001).

### References

- [1] A Arellano, S. Santoyo, and C. Martin, C : Eur. J. Pharm. Sci. Vol. 7 (1998), p179
- [2] T. Ogiso, T. Paku, M. Iwaki, and T. Tanino: Biol. Pharm. Bull. Vol.18(1995), p1566
- [3] N.S.Thomas, and R.Panchagnula: Eur. J. Pharm. Sci. Vol. 18 (2003), p 71
- [4] T. Ngawhirunpat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, S. Panomsuk, and L. Chanchome: Pharm. Dev. Tech. Vol.13 (2008), p75
- [5] W. Williams, and B. W. Barry: Adv. Drug Del. Rev. Vol. 56 (2004), p603
- [6] V. Dubey, D. Mishra and N.K. Jai: Eur. J. Pharm. Vol. 67 (2007), p398

## Research Article

# Characterization and *In Vitro* Skin Permeation of Meloxicam-Loaded Liposomes versus Transfersomes

Sureewan Duangjit, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, and Tanasait Ngawhirunpat

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchan Palace Campus, Nakhon Pathom 73000, Thailand

Correspondence should be addressed to Tanasait Ngawhirunpat, tanasait@su.ac.th

Received 16 May 2010; Revised 11 September 2010; Accepted 18 October 2010

Academic Editor: Jia You Fang

Copyright © 2011 Sureewan Duangjit et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The goal of this study was to develop and evaluate the potential use of liposome and transfersome vesicles in the transdermal drug delivery of meloxicam (MX). MX-loaded vesicles were prepared and evaluated for particle size, zeta potential, entrapment efficiency (%EE), loading efficiency, stability, and *in vitro* skin permeation. The vesicles were spherical in structure, 90 to 140 nm in size, and negatively charged (−23 to −43 mV). The %EE of MX in the vesicles ranged from 40 to 70%. Transfersomes provided a significantly higher skin permeation of MX compared to liposomes. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis indicated that the application of transfersomes significantly disrupted the stratum corneum lipid. Our research suggests that MX-loaded transfersomes can be potentially used as a transdermal drug delivery system.

## 1. Introduction

Transdermal drug delivery systems (TDDs) offer a number of potential advantages over conventional methods such as injectable and oral delivery [1]. However, the major limitation of TDDs is the permeability of the skin; it is permeable to small molecules and lipophilic drugs and highly impermeable to macromolecules and hydrophilic drugs. The main barrier and rate-limiting step for diffusion of drugs across the skin is provided by the outermost layer of the skin, the stratum corneum (SC) [2]. Several strategies have been developed to overcome the skin's resistance, including the use of prodrugs, ion pairs, liposomes, microneedles, ultrasound, and iontophoresis [3–6].

Various types of liposomes (LPs) exist, such as traditional liposomes, niosomes, ethosomes, and transfersomes [3, 7–12]. Various LPs have been extensively investigated for improving skin permeation enhancement. Liposomes are promising carriers for enhancing skin permeation because they have high membrane fluidity. Previous reports indicate that liposomes can deliver a large quantity of hydrophilic drugs (e.g., sodium fluorescein [13], carboxyfluorescein [14]), lipophilic drugs (e.g., retinoic acid [11], tretinoin

[12]), proteins, and macromolecules through the skin. Many factors influence the percutaneous penetration behavior of LPs, including particle size, surface charge, lipid composition, bilayer elasticity, lamellarity, and type of LP [7, 12].

Cevc's group introduced Transfersomes, which are the first generation of elastic vesicles. Transfersomes are prepared from phospholipids and edge activators. An edge activator is often a single-chain surfactant with a high radius of curvature that destabilizes the lipid bilayers of the vesicles and increases the deformability of the bilayers. Sodium cholate, sodium deoxycholate, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80, and dipotassium glycyrrhizinate were employed as edge activators. Compared with subcutaneous administration, transfersomes improved *in vitro* skin permeation of various drugs, penetrated intact skin *in vivo*, and efficiently transferred therapeutic amounts of drugs [9, 15, 16]. However, the mechanism by which LPs and their analogs deliver drugs through the skin is not fully understood [14].

Meloxicam (Figure 1) has low aqueous solubility, and it is a highly potent, nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that is used for treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [6, 17–19]. MX shows similar efficacy



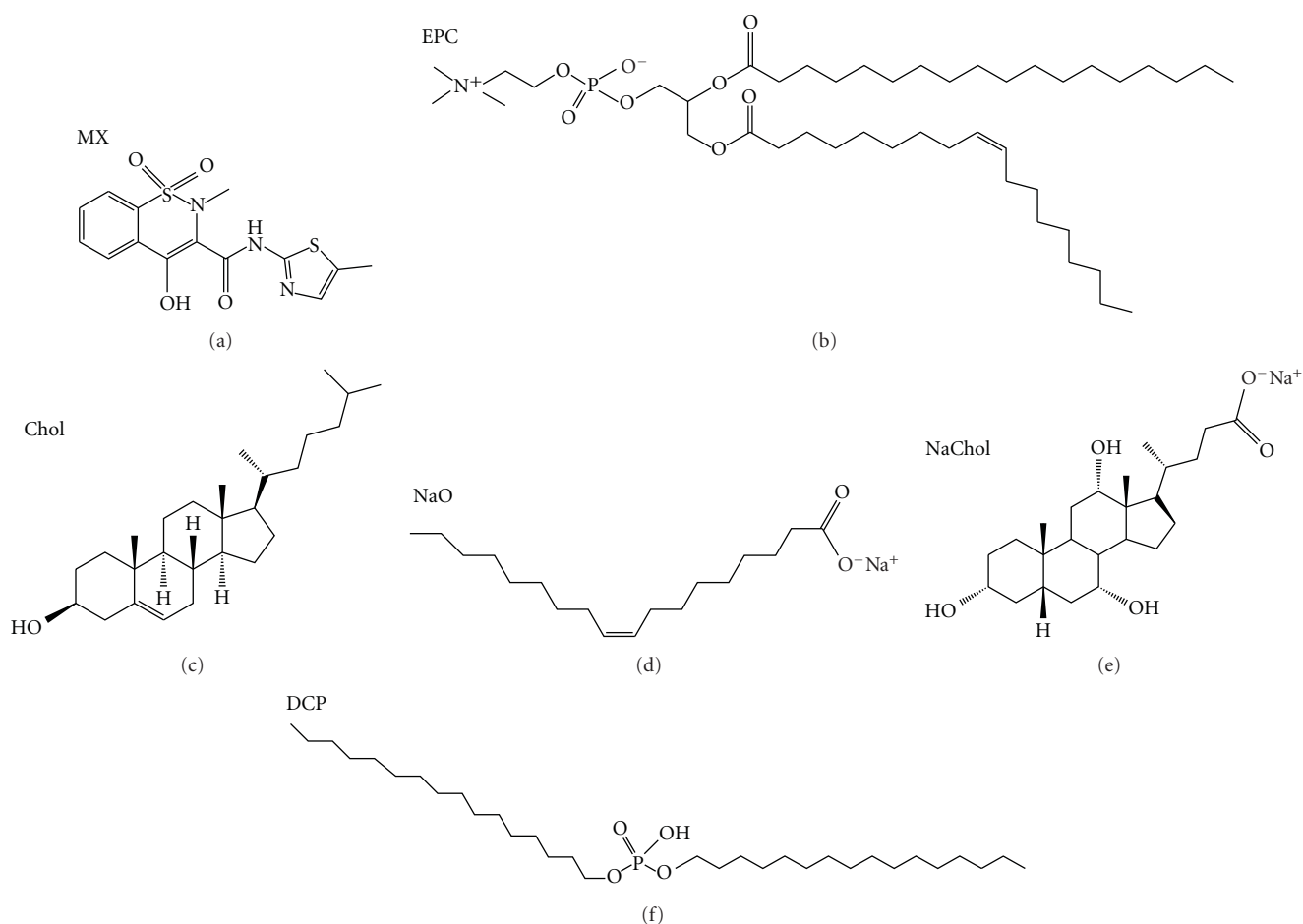


FIGURE 1: The chemical structure of meloxicam and the lipid compositions of the liposomes.

for reducing pain and inflammatory symptoms, but it has lower toxicity than other NSAIDs. Although MX is relatively potent and safe, its limitations include low solubility, low incorporation in formulations, and low skin permeation [6, 18–25]. In this study, vesicles were used as a novel MX transdermal drug delivery system. The system was developed and evaluated for its physicochemical characteristics, such as particle size, surface charge, entrapment efficiency, loading efficiency, stability, and *in vitro* skin permeation. The type of vesicles (liposomes and transfersomes), the composition of lipid in the liposomes (cholesterol), and transfersomes (cholesterol and surfactants) were evaluated. Three surfactants that differ in length of carbon chains were used for the preparation of transfersomes: sodium oleate (NaO, C<sub>18</sub>), sodium cholate (NaChol, C<sub>24</sub>), and dicetylphosphate (DCP, C<sub>32</sub>). Characterization of skin permeation was performed using FTIR and DSC. Figure 1 shows the chemical structure of meloxicam and the lipid compositions of the liposomes.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Materials.** Phosphatidylcholine (PC) from eggs was purchased from GmbH. Cholesterol (Chol) was purchased from Carlo Erba Reagenti. Sodium cholate (NaChol) was

purchased from Acros Organics. Sodium oleate (NaO) and dicetylphosphate (DCP) were purchased from Sigma-Aldrich. Meloxicam (MX) was supplied from Fluka.

**2.2. Preparation of Meloxicam-Loaded Liposomes, Transfersomes, and Suspensions.** Liposomes containing a controlled amount of PC and various amounts of MX were formulated. The MX concentration was varied from 2.5 to 70.0 wt. % of the PC. The sonication method was used to prepare different formulations; they were composed of bilayer-forming PC and either Chol, NaO, NaChol, or DCP in a molar ratio of 10 : 2. The PC, Chol, NaO, NaChol, DCP, and MX were each briefly dissolved in chloroform:methanol (2 : 1 v/v). In preparing MX-loaded liposomes and transfersomes, the materials were deposited in a test tube, and the solvent was evaporated with nitrogen gas. The lipid film was placed in a desiccator connected to a vacuum pump for a minimum of 6 h to remove the remaining organic solvent. The dried lipid film was hydrated with Tris buffer. Following hydration, the dispersion was sonicated in a bath for 30 min and then probe-sonicated for 2 cycles of 30 min. The lipid compositions of the different formulations utilized in this study are listed in Table 1.

TABLE 1: The lipid compositions of the different formulations used in study.

Name (molar ratio)	Composition (%W/V)						PBS ph 7.4
	MX	PC	Chol	NaO	NaChol	DCP	
MX/PC (2 : 10)	0.07	0.77	—	—	—	—	100 mL
MX/PC/Chol (2 : 10 : 2)	0.07	0.77	0.07	—	—	—	100 mL
MX/PC/NaO (2 : 10 : 2)	0.07	0.77	—	0.06	—	—	100 mL
MX/PC/NaO/Chol (2 : 10 : 2 : 2)	0.07	0.77	0.07	0.06	—	—	100 mL
MX/PC/NaChol (2 : 10 : 2)	0.07	0.77	—	—	0.08	—	100 mL
MX/PC/NaChol/Chol (2 : 10 : 2 : 2)	0.07	0.77	0.07	—	0.08	—	100 mL
MX/PC/DCP (2 : 10 : 2)	0.07	0.77	—	—	—	0.11	100 mL
MX/PC/DCP/Chol (2 : 10 : 2 : 2)	0.07	0.77	0.07	—	—	0.11	100 mL

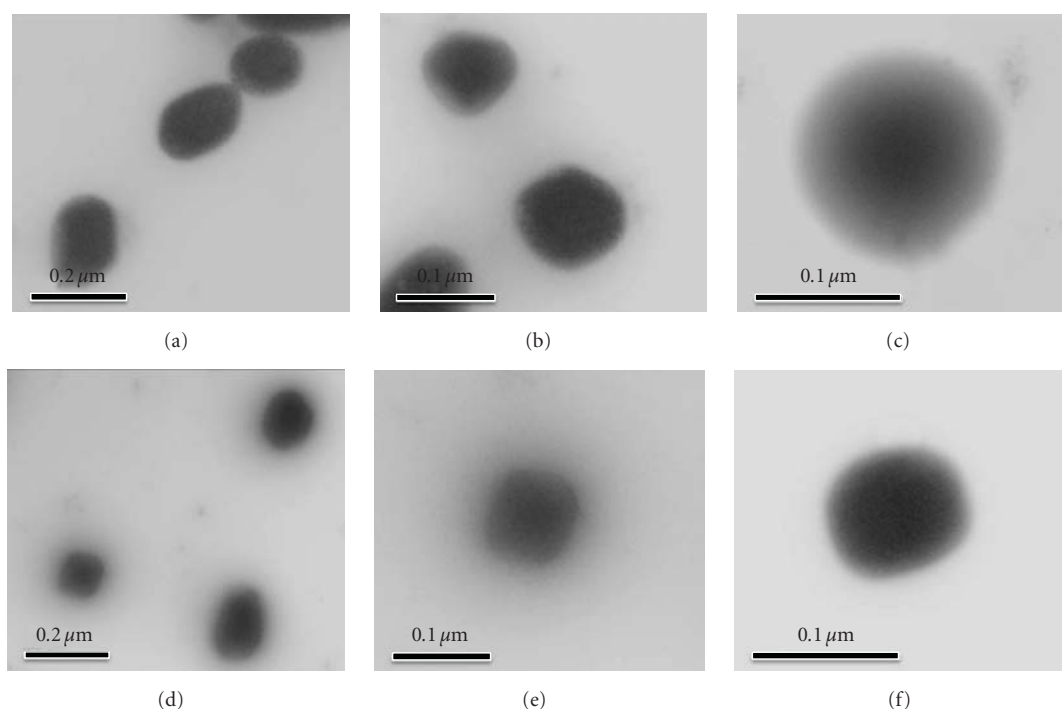


FIGURE 2: Transmission electron microscopy of MX loaded in vesicles. (a) visualization of MX loaded in liposomes (PC) (10,000x), (b) visualization of MX loaded in liposomes (PC) (30,000x), (c) visualization of MX loaded in liposomes (PC) (50,000x), (d) Visualization of MX loaded in transfersomes (PC/NaChol) (10,000x), (e) visualization of MX loaded in transfersomes (PC/NaChol) (30,000x), and (f) visualization of MX loaded in transfersomes (PC/NaChol) (50,000x).

For the preparation of MX suspensions, the saturated solubility of MX in water was determined to ensure excess drug in MX suspension. The solubility of MX was determined by adding excess amount of MX to 5 mL of water in a glass vial and stirring by a magnetic stirrer for 24 h. The sample was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter in order to remove undissolved drugs in the saturated solution. The concentration of MX was analyzed by HPLC. The MX suspension was prepared by adding MX to distilled water at a concentration 2 times higher than the solubility of MX and stirring for 24 h to ensure constant thermodynamic activity throughout the course of the permeation experiment. The particle size of MX suspension was determined, and the MX suspension was used in the skin permeation experiment.

### 2.3. Characterization of Liposomes and Transfersomes

**2.3.1. Particle Size and Surface Charge.** The droplet size and zeta potential of the liposomes and transfersomes were determined by a Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer and Zeta Potential Analyzer at room temperature. One mL of the liposome and transfersome suspensions were diluted with 14 mL and 2 mL deionized water, respectively.

**2.3.2. Transmission Electron Microscopy.** Transmission Electron Microscopy (TEM) was used to visualize the liposomal and transfersomal vesicles. The vesicles were dried on a copper grid and adsorbed with filter paper. After drying, the sample was viewed under the microscope at 10–100 k magnification at an accelerating voltage of 100 kV.

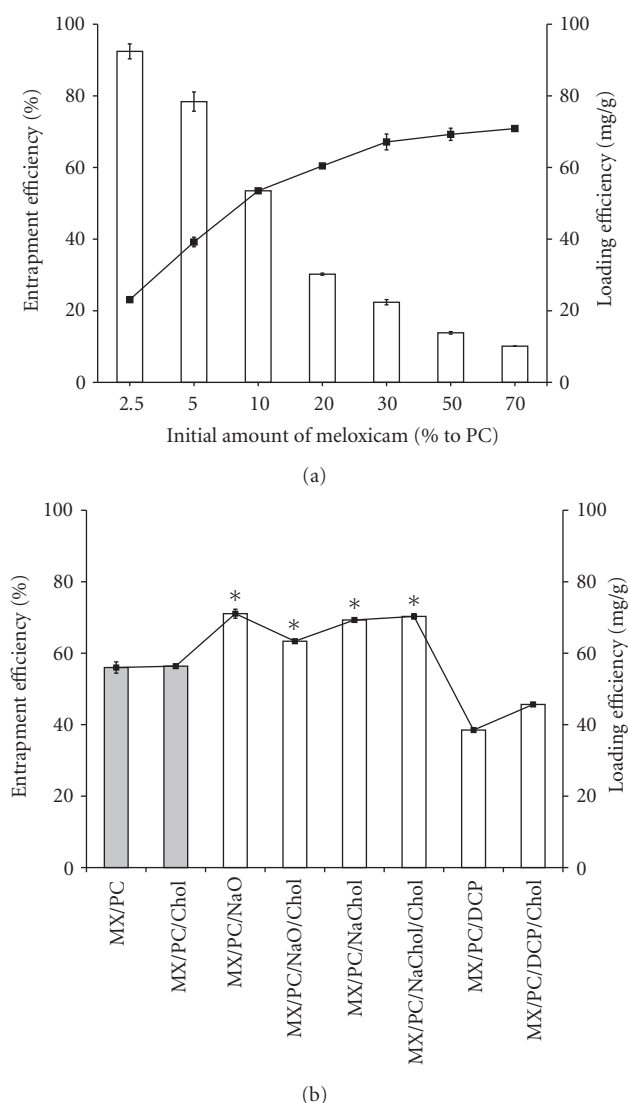


FIGURE 3: (a) The effect of initial amount of meloxicam (2.5, 5, 10, 20, 30, 50, and 70%) added in liposomes on percentage entrapment efficiency (white bar) and loading efficiency (fill square) of meloxicam loaded in liposomes composed of PC. Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) (b) The percentage entrapment efficiency (white bar) and loading efficiency (fill square) of meloxicam loaded in different formulations: (shaded square) liposomes and (white square) transfersomes. Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ).

### 2.3.3. Entrapment Efficiency (%EE) and Loading Efficiency.

The concentration of MX in the formulation was determined by HPLC analysis after disruption of the vesicles (liposomes and transfersomes) with Triton X-100 (0.1% w/v) at a 1:1 volume ratio and appropriate dilution with PBS (pH 7.4). The vesicle/Triton X-100 solution was centrifuged at 10,000 rpm at 4°C for 10 min. The supernatant was filtered with a 0.45  $\mu$ m nylon syringe filter. The entrapment efficiencies and the loading efficiencies of the MX-loaded formulation were calculated by (1) and (2), respectively.

$$\% \text{ entrapment efficiency} = \left( \frac{C_L}{C_i} \right) \times 100, \quad (1)$$

where  $C_L$  is the concentration of MX loaded in the formulation as described in the above methods, and  $C_i$  is the initial concentration of MX added into the formulation

$$\text{loading efficiency} = \frac{D_t}{L_t}, \quad (2)$$

where  $D_t$  is the total amount of MX in the formulation and  $L_t$  is the total amount of PC added into the formulation.

### 2.3.4. Stability Evaluation of Liposomes and Transfersomes.

Liposomes and transfersomes were stored at  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (room temperature, RT) for 30 days. Both the physical and the chemical stability of MX were evaluated. The physical stability was assessed by visual observation for sedimentation and particle size determination. The chemical stability was determined by measuring the MX content by HPLC on days 0, 1, 7, 14, and 30.

**2.4. In Vitro Skin Permeation Study.** Shed snake skin from the Siamese cobra (*Naja kaouthia*) was used as a model membrane for the skin permeation study because of its similarity to human skin in lipid content and permeability. The skin samples were mounted between the two half-cells of a side-by-side diffusion chamber with a 37°C water jacket to control the temperature. The dorsal surface of the skin was placed in contact with the donor chamber, which was filled with the liposome formulation. The receptor chamber was filled with 0.1 M PBS (pH 7.4) and stirred with a star-head Teflon magnetic bar driven by a synchronous motor. At time intervals of 0.5, 1, 2, 4, 8 and, 24 h, a 1 mL aliquot of receptor was withdrawn, and the same volume of fresh medium was added back into the chamber. The concentration of MX in the samples was analyzed by HPLC. The concentration of permeants in the samples was analyzed by HPLC, and the cumulative amount was plotted against time. The steady-state flux was determined as the slope of linear portion of the plot. Lag time was also obtained by extrapolating the linear portion of the penetration profile to the abscissa.

**2.5. HPLC Analysis.** The MX concentration was analyzed by HPLC [28] using an Eclipse XDB-C18 column. The mobile phase was a mixture of potassium dihydrogen phosphate pH 4.4, methanol, and acetonitrile at a ratio of 45 : 45 : 10 (v/v/v). A 20  $\mu$ L injection volume was used with a flow rate of 1.0 mL/min, and UV detection was viewed at 364 nm. The quantitative determination of MX in the tested sample was obtained from the calibration curve, which gave good linearity at the range of 0.1–50  $\mu$ g/mL.

### 2.6. Characterization of Snake Skin after Skin Permeation

**2.6.1. FT-IR Analysis of Shed Snake Skin.** Following the skin permeation study, the skin was washed with water and blotted dry by keeping in the desiccator for 24 h. The spectrum of the snake skin was recorded in the range of 4000–500  $\text{cm}^{-1}$  using an FT-IR spectrophotometer. The FT-IR spectrum of the untreated skin was also recorded and used as a control.

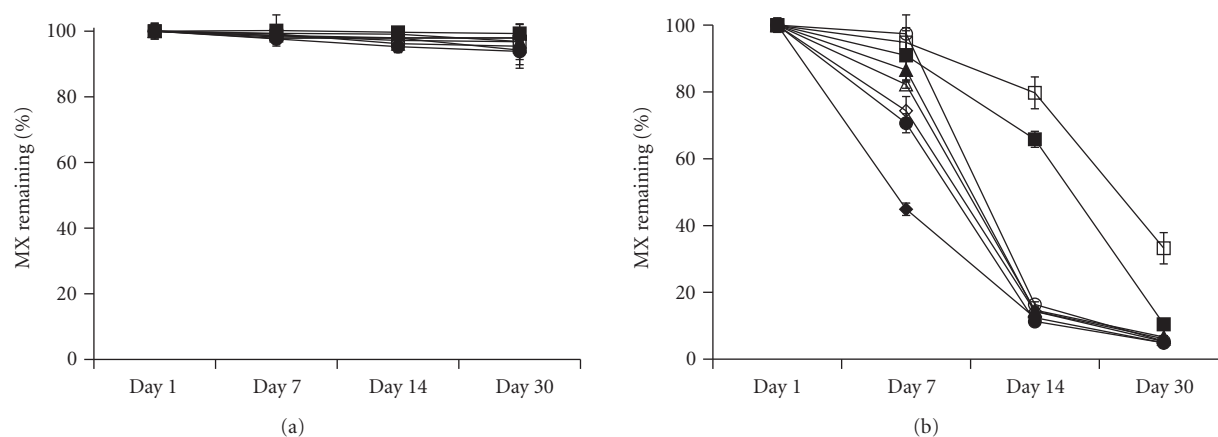


FIGURE 4: The percentage of meloxicam remaining in vesicles composed of different compositions: (solid diamond) PC, (white diamond) PC/Chol, (solid triangle) PC/NaO, (white triangle) PC/NaO/Chol, (solid circle) PC/NaChol, (white circle) PC/NaChol/Chol, (solid square) PC/DCP, and (white square) PC/DCP/Chol following storage at (a) 4°C and (b) RT for 30 days. Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

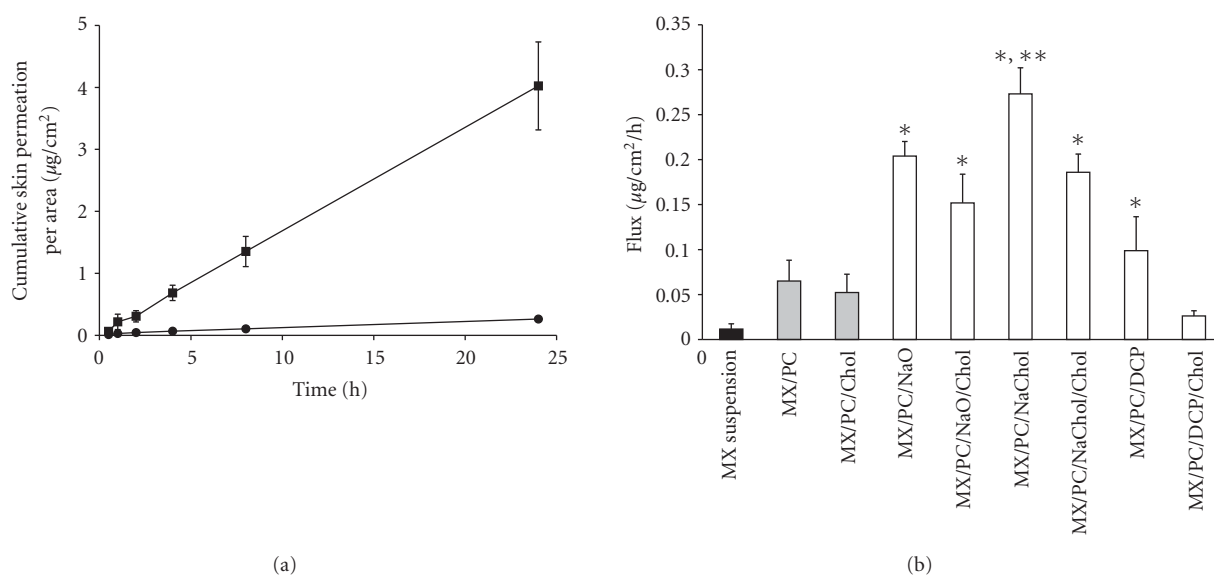


FIGURE 5: (a) The skin permeation profile of meloxicam from (solid circle) MX suspensions (control) and (solid square) MX/PC/NaChol. (b) The fluxes of meloxicam through shed snake skin from different formulations: (solid square) control, (shaded square) liposomes, and (white square) transfersomes. Different values \* were statistically significant ( $P < .05$ ) compared with MX suspensions (control). Different values \*\* were statistically significant ( $P < .05$ ) compared with liposomes. Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3-6$ ).

**2.6.2. Differential Scanning Calorimetry (DSC) Analysis of Shed Snake Skin.** Thermal analysis of the skin after the permeation study prepared with the same method as FTIR was performed with a Sapphire DSC. The skin sample (2 mg) was weighed into an aluminum crimp pan. The samples were heated from  $-30$  to  $320^\circ\text{C}$  at a heating rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . All DSC measurements were collected under a nitrogen atmosphere with a flow rate of  $100\text{ mL}/\text{min}$ .

**2.7. Data Analysis.** Data are expressed as the means  $\pm$  standard deviation (SD) of the mean, and statistical analysis was carried out employing the one-way analysis of variance

(ANOVA) followed by an LSD *post hoc* test. A value of  $P < .05$  was considered statistically significant.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Physicochemical Characteristics of Liposomes and Transfersomes.** The particle size range for all formulations, except the MX suspensions, was less than  $200\text{ nm}$  ( $89$  to  $137\text{ nm}$ ) with a narrow size distribution. The particle size range of the MX suspensions was significantly larger than that of the liposomes (Table 2). The vesicles containing cholesterol had a slightly lower particle size than without cholesterol.

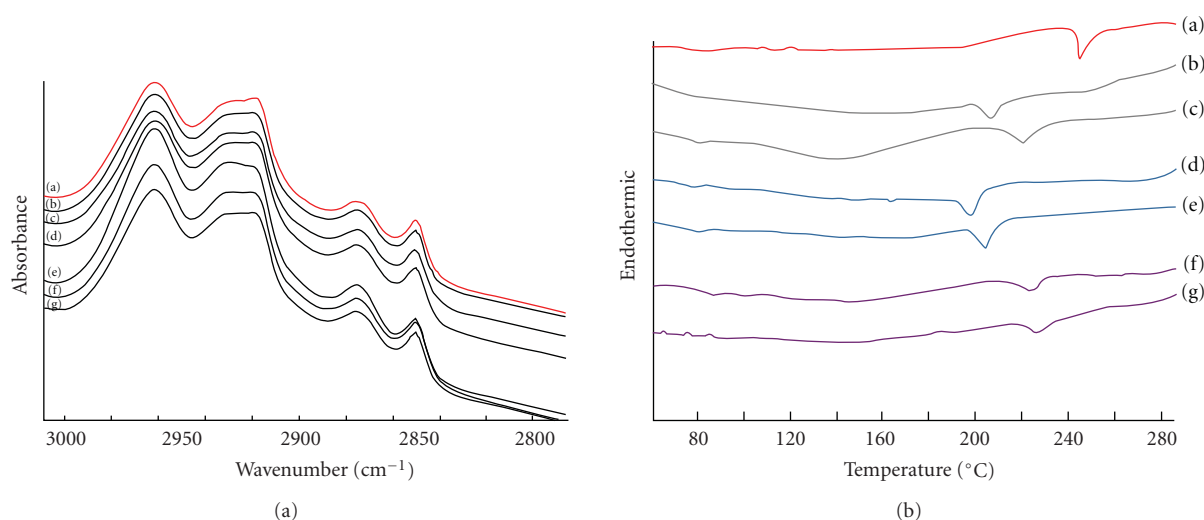


FIGURE 6: (a) FT-IR spectra profile of shed snake skin after 24 h transfersomes skin permeation. (a) Untreated skin, (b) PC/NaO, (c) PC/NaO/Chol, (d) PC/NaChol, (e) PC/NaChol/Chol, (f) PC/DCP, and (g) PC/DCP/Chol and (b) DSC thermogram of shed snake skin after 24 h MX suspensions (control) and transfersomes skin permeation. (a) MX suspensions, (b) PC/NaO, (c) PC/NaO/Chol, (d) PC/NaChol, (e) PC/NaChol/Chol, (f) PC/DCP, and (g) PC/DCP/Chol.

TABLE 2: Particle size and zeta potential in various formulations.

Name	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
MX suspensions	2411 ± 84.2	-19.3 ± 0.7
MX/PC	107.0 ± 5.0	-35.0 ± 0.5
MX/PC/Chol	100.3 ± 0.6	-23.5 ± 0.2
MX/PC/NaO	107.4 ± 0.5	-43.4 ± 0.1
MX/PC/NaO/Chol	100.5 ± 0.6	-23.1 ± 0.0
MX/PC/NaChol	93.0 ± 1.0	-32.7 ± 0.7
MX/PC/NaChol/Chol	88.6 ± 0.7	-28.9 ± 0.5
MX/PC/DCP	137.2 ± 6.1	-35.2 ± 0.6
MX/PC/DCP/Chol	126.5 ± 1.6	-29.3 ± 0.5

Each value represents the mean ± SD ( $n = 3$ ).

These results might be attributed to cholesterol causing the bilayer to be more compact [10, 26, 29–31]. The particle size of the transfersomes with different types of surfactant did not show a significant difference. These results indicated that the particle size of the vesicles was not affected by lipid composition (cholesterol) and surfactant.

The zeta potential of all vesicle formulations were negative (-23 to -43 mV) due to the net charge of the lipid composition in the formulations. PC is a zwitterionic compound with an isoelectric point (pI) between 6 and 7 [32]. Under experimental conditions (pH 7.4), where the pH was higher than its pI, PC carried a net negative charge. The surfactants used were anionic surfactants, and the anion form of MX was also the predominant form at pH 7.4 [25]. Therefore, a negative charge in all formulations was observed. Because the negatively charged liposome formulations strongly improved skin permeation of drugs in transdermal delivery [12], these formulations were chosen to be tested for MX permeation in our study.

The morphology of the two-dimensional vesicles was further evaluated by TEM, justifying the vesicular characteristics. MX loaded in liposomes prepared from PC and PC/NaChol was spherical in shape (Figures 2(a), 2(b), and 2(c)) and spherical with unilamellar vesicles (Figures 2(d), 2(e), and 2(f)), respectively.

**3.2. Entrapment Efficiency and Loading Efficiency.** The entrapment efficiencies and loading efficiencies of the MX-loaded formulations are presented in Figure 3(a). The 2.5% MX-LP formulation had the highest entrapment efficiency but the lowest loading efficiency, while the 70% MX-LP formulation showed the highest loading efficiency but the lowest entrapment efficiency. Therefore, there should be an optimum ratio between PC and MX for developing MX-loaded vesicles as carriers for transdermal drug delivery. The optimum ratio, which offered high entrapment efficiency and high loading efficiency, was 10% MX-LP. This ratio was used to prepare the vesicles.

The entrapment efficiency and loading efficiency of transfersome formulations were significantly higher than the liposome formulations (Figure 3(b)). The entrapment efficiency of MX in the vesicles ranged from 38% to 71%. The entrapment of MX in liposomes was lower than transfersomes except in formulations with DCP. This result might be attributed to interactions between the surfactants (NaO and NaChol) and MX when the complex was inserted into the transfersomes bilayer. Fang et al. reported that adding surfactant (sodium stearate) to phosphatidylethanolamine vesicles significantly increased the entrapment efficiency of 5-aminolevulinic acid [26]. The results indicated that the type of carrier systems and lipid composition affected the entrapment efficiency and loading efficiency of MX in the vesicle formulations.



The entrapment efficiency of the vesicles with and without cholesterol did not show a significant difference. However, the entrapment efficiencies of the transfersome formulations changed depending on the type of surfactant used and ranked PC/NaO(C<sub>18</sub>)>PC/NaChol (C<sub>24</sub>)>PC/DCP(C<sub>32</sub>). The lower the carbon chain length of the surfactants in the formulation, the higher the entrapment efficiency. The increase in the carbon chain length of the surfactant increased the lipophilicity and the solubility of lipophilic drug in the bilayer [10, 27]. This characteristic may explain the increase in entrapment efficiency of MX in the bilayer of the vesicles. Surfactant may also compete with MX when arranging in the bilayer and therefore exclude the drug as it assembles into the bilayer of the vesicles. The data indicated that the entrapment efficiency and loading efficiency are independent of cholesterol but dependent on the surfactant in the formulations.

**3.3. Stability Evaluation of Liposomes and Transfersomes.** Liposomes and transfersomes were stored at 4°C or RT for 30 days. The physical (particle size determination) and chemical (percent MX remaining in the formulation) stability of the vesicles are presented in Table 3 and Figure 4, respectively. No sedimentation was found in any vesicle formulation after fresh preparation. After storage at 4°C for 30 days, there was no sedimentation, but the average size of the vesicles in all formulations slightly increased. Nevertheless, the average size remained under 200 nm (Table 3). After storage at RT for 7 days, no sedimentation was present in any formulation (data not shown). When evaluating the chemical stability of the vesicles, the percentage of MX remaining at 4°C for 30 days was in the range of 93% to 99% (Figure 4(a)), but it was 4% to 33% for the samples at RT (Figure 4(b)). The degradation rate of the MX-loaded vesicles stored at 4°C was not significantly different than those that were freshly prepared. This reveals that the degradation of MX is independent of lipid composition but dependent on the storage temperature and age.

**3.4. In Vitro Skin Permeation Study.** Figure 5(a) illustrates the permeation profiles of MX suspensions (control) and MX-loaded transfersomes with NaChol. The cumulative amount of drug increased linearly with time after a short lag time (0.5–0.8 h). This linear accumulation was also observed for other formulations (data not shown). Figure 5(b) shows the flux (F) of MX through the snake skin calculated from the permeation profiles. The F of MX permeated through the skin in all vesicle formulations was significantly higher than the MX suspensions. The vesicle systems were able to promote skin permeation of an active drug by a variety of mechanisms: (a) the free drug mechanism, (b) the penetration-enhancing process of the liposome components, (c) vesicle adsorption to and/or fusion with the SC, and (d) intact vesicle penetration into and through the intact skin and the localization at the site of action [33–35]. Moreover, the similar predominance to the lipid bilayer of biological membranes [36] and the nanometer size range of the vesicles may be also influenced [7, 26, 30]. These results indicated

that the vesicle system can overcome the barrier function of the stratum corneum by various mechanisms and their physicochemical properties.

The F of MX permeated through the skin in transfersomes was significantly higher than in liposomes. Transfersomes have shown to be successful in the delivery of drugs into the skin, including diclofenac, triamcinolone acetonide, hydrocortisone, and estradiol. Because transfersomes are composed of PC and surfactants, they can squeeze through the pores in the SC, which are smaller than one-tenth their diameter [3]. They can also adsorb onto or fuse with the SC, and the intact vesicle can penetrate into and through the intact skin.

The F of MX in the vesicles composed of cholesterol was slightly lower than vesicles without cholesterol. An increase in cholesterol could lead to increased stability and rigidity and decrease the permeability of the lipid bilayer, which may cause lower release of MX and lower permeation of MX through the skin [31]. The F of MX permeated from transfersomes with different compositions of surfactants are ranked as follows: NaO (C<sub>18</sub>)~NaChol (C<sub>24</sub>)>DCP (C<sub>32</sub>). The lower the carbon chain length of the surfactant in the formulation, the higher the skin permeation of MX. The particle size and %EE of the vesicles composed of NaO and NaChol were smaller and higher than vesicles containing DCP, respectively. These results indicated that the barrier function of stratum corneum can be overcome by several factors, including physicochemical properties of vesicle systems (size, charge, and %EE), lipid composition (cholesterol, surfactant), and type of vesicle system (liposomes, transfersomes).

The research results indicated that the skin permeability of MX-loaded transfersomes and liposomes were greater than that of MX suspensions and that both PC and surfactant were key factors. Surfactants are enhancers that solubilize the lipophilic compound; they also have the potential to solubilize the lipid within the SC. Surfactants swell the SC, interact with the intercellular keratin, and fluidize the SC lipid to create channels that allow increased drug delivery.

**3.5. Characterization of the Skin.** The FT-IR spectrum of the snake skin as a model for the SC provided a measure of fluidity of the SC lipid. The comparison of the spectral profile of the untreated skin and treated skin with transfersomes, with and without cholesterol, resulted in shifts to higher frequencies. There was an absorbance broadening for both the C–H (CH<sub>2</sub>) asymmetric stretching peak near 2920 cm<sup>-1</sup> and the C–H (CH<sub>2</sub>) symmetric stretching peak near 2850 cm<sup>-1</sup> (Figure 6(a)) [37]. The data indicated that flexibility of the SC lipid upon application of transfersomes occurred. Thus, it can be hypothesized that transfersomes permeated through the skin by disruption of the SC lipid structure.

The disruption of the SC lipid by the application of transfersomes was further evaluated by DSC (Figure 6(b)). The SC lipid of the snake skin exist as a solid gel at temperature of 244°C. In the DSC study, when the skin was treated with transfersomes, which exists as liquid

TABLE 3: Particle size of formulations composed of different formulations following storage at 4°C for 30 days.

Name	Particle size (nm)				
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 30
MX/PC	107.0 ± 5.0	113.4 ± 4.3	114.0 ± 1.1	114.5 ± 3.7	126.9 ± 16.0
MX/PC/Chol	100.3 ± 0.6	130.3 ± 15.5	159.0 ± 1.2	163.1 ± 2.5	182.6 ± 4.5
MX/PC/NaO	107.4 ± 0.5	93.8 ± 2.3	91.7 ± 0.9	93.8 ± 6.9	97.4 ± 2.0
MX/PC/NaO/Chol	100.5 ± 0.6	99.9 ± 1.1	96.1 ± 1.2	100.5 ± 5.5	110.6 ± 25.7
MX/PC/NaChol	93.0 ± 1.0	93.0 ± 1.0	93.6 ± 2.0	94.5 ± 1.6	92.1 ± 2.1
MX/PC/NaChol/Chol	88.6 ± 0.7	74.0 ± 2.5	87.4 ± 7.8	85.4 ± 4.3	85.1 ± 2.0
MX/PC/DCP	137.2 ± 6.1	144.5 ± 6.8	152.4 ± 1.2	162.3 ± 2.9	162.0 ± 4.9
MX/PC/DCP/Chol	126.5 ± 1.6	131.6 ± 3.9	139.5 ± 2.8	166.3 ± 12.9	184.9 ± 3.0

Each value represents the mean ± SD ( $n = 3$ ).

state vesicles, their thermal properties shifted (melting point;  $T_m$ ) as follows: PC/NaChol, 198°C; PC/NaO, 207°C; PC/DCP, 218°C; PC/NaChol/Chol, 207°C; PC/NaO/Chol, 222°C; PC/DCP/Chol, 221°C. The data indicated that the  $T_m$  of skin treated with transfersomes was significantly lower than that of the untreated skin. The change into lower transition temperature suggests an increase in the gross fluidity of the SC lipids. This is consistent with the general view that the mechanism of action of the surfactant is attributed to the alteration of the lipid organization and an increase in lipid lamellae disorder in the SC. Moreover, the  $T_m$  of the skin treated with transfersomes with cholesterol was significantly higher than those without cholesterol. If cholesterol could be complexed with phospholipids in the skin, it could add more structure to the bilayer. These results were in accordance with skin permeation data showing that transfersomes increased the skin permeation of MX, and the addition of cholesterol in the transfersomes also led to a decrease in skin permeation of MX when compared with transfersomes without cholesterol. Transfersomes may be used as alternative carriers for transdermal drug delivery potential because they interact with solid gel phase SC lipids and thus leading to disruption and fluidization of the SC lipid.

#### 4. Conclusion

In the present study, MX-loaded transfersomes were successfully prepared by a sonication method. The use of surfactants containing medium length carbon chains, including NaO ( $C_{18}$ ) and NaChol ( $C_{24}$ ), in the transfersomes resulted in a high entrapment efficiency. Transfersomes provide greater MX skin permeation than liposome and MX suspensions. The mechanism of this increase in MX permeation may be through transfersomes' disruption of the SC lipid. The data indicate that the barrier function of SC was affected by several factors, including physicochemical properties of vesicle systems (size, charge, %EE), lipid composition (cholesterol, surfactant), and type of vesicle system (liposomes, transfersomes). Our research suggests that utilizing MX-loaded transfersomes as a transdermal therapeutic agent shows potential.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant no. PHD/0141/2550), the Thailand Research Funds (Grant no. RSA 5280001) for financial support.

#### References

- [1] M. M. Badran, J. Kuntsche, and A. Fahr, "Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: dependency on needle size and applied formulation," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 36, no. 4-5, pp. 511–523, 2009.
- [2] H. Trommer and R. H. H. Neubert, "Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review," *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 19, no. 2, pp. 106–121, 2006.
- [3] B. W. Barry, "Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 14, no. 2, pp. 101–114, 2001.
- [4] E. W. Smith and H. I. Maibach, *Percutaneous Penetration Enhancement*, Taylor & Francis, Boca Raton, Fla, USA, 2nd edition, 2006.
- [5] A. C. Williams and B. W. Barry, "Penetration enhancers," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56, no. 5, pp. 603–618, 2004.
- [6] Y.-C. Ah, J.-K. Choi, Y.-K. Choi, H.-M. Ki, and J.-H. Bae, "A novel transdermal patch incorporating meloxicam: in vitro and in vivo characterization," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 385, pp. 12–19, 2010.
- [7] P. Karande and S. Mitragotri, "Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1788, no. 11, pp. 2362–2373, 2009.
- [8] J. Montanari, A. P. Perez, F. Di Salvo et al., "Photodynamic ultradeformable liposomes: design and characterization," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 330, no. 1-2, pp. 183–194, 2007.
- [9] G. Cevc, D. Gebauer, J. Stieber, A. Schätzlein, and G. Blume, "Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1368, no. 2, pp. 201–215, 1998.
- [10] A. R. Mohammed, N. Weston, A. G. A. Coombes, M. Fitzgerald, and Y. Perrie, "Liposome formulation of poorly

- water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 285, no. 1-2, pp. 23-34, 2004.
- [11] L. Montenegro, A. M. Panico, A. Ventimiglia, and F. P. Bonina, "In vitro retinoic acid release and skin permeation from different liposome formulations," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 133, no. 1-2, pp. 89-96, 1996.
- [12] C. Sinico, M. Manconi, M. Peppi, F. Lai, D. Valenti, and A. M. Fadda, "Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction," *Journal of Controlled Release*, vol. 103, no. 1, pp. 123-136, 2005.
- [13] N. Pérez-Cullell, L. Coderch, A. De La Maza, J. L. Parra, and J. Estelrich, "Influence of the fluidity of liposome compositions on percutaneous absorption," *Drug Delivery*, vol. 7, no. 1, pp. 7-13, 2000.
- [14] D. D. Verma, S. Verma, G. Blume, and A. Fahr, "Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 55, no. 3, pp. 271-277, 2003.
- [15] M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Naggar, and N. M. Khalafallah, "Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 322, no. 1-2, pp. 60-66, 2006.
- [16] A. Viriyaroj, T. Ngawhirunpat, M. Sukma, P. Akkaramongkolporn, U. Ruktanonchai, and P. Opanasopit, "Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 14, no. 6, pp. 665-671, 2009.
- [17] R. Ambrus, P. Kocbek, J. Kristl, R. Šibanc, R. Rajkó, and P. Szabó-Révész, "Investigation of preparation parameters to improve the dissolution of poorly water-soluble meloxicam," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 381, no. 2, pp. 153-159, 2009.
- [18] H.-K. Han and H.-K. Choi, "Improved absorption of meloxicam via salt formation with ethanolamines," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 65, no. 1, pp. 99-103, 2007.
- [19] J.-S. Chang, Y.-B. Huang, S.-S. Hou, R.-J. Wang, P.-C. Wu, and Y.-H. Tsai, "Formulation optimization of meloxicam sodium gel using response surface methodology," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 338, no. 1-2, pp. 48-54, 2007.
- [20] J.-W. Bae, M.-J. Kim, C.-G. Jang, and S.-Y. Lee, "Determination of meloxicam in human plasma using a HPLC method with UV detection and its application to a pharmacokinetic study," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 859, no. 1, pp. 69-73, 2007.
- [21] R. Jantharaprapap and G. Stagni, "Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 343, no. 1-2, pp. 26-33, 2007.
- [22] R. Quintana, L. Kopcow, G. Marconi, E. Young, C. Yovanovich, and D. A. Paz, "Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model," *Fertility and Sterility*, vol. 90, no. 4, pp. 1511-1516, 2008.
- [23] N. Seedher and S. Bhatia, "Mechanism of interaction of the non-steroidal antiinflammatory drugs meloxicam and nimesulide with serum albumin," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 39, no. 1-2, pp. 257-262, 2005.
- [24] Y. Yuan, S.-M. Li, F.-K. Mo, and D.-F. Zhong, "Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 321, no. 1-2, pp. 117-123, 2006.
- [25] P. Luger, K. Daneck, W. Engel, G. Trummlitz, and K. Wagner, "Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. 3, pp. 175-187, 1996.
- [26] Y.-P. Fang, Y.-H. Tsai, P.-C. Wu, and Y.-B. Huang, "Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 356, no. 1-2, pp. 144-152, 2008.
- [27] C. Bernsdorff, A. Wolf, R. Winter, and E. Gratton, "Effect of hydrostatic pressure on water penetration and rotational dynamics in phospholipid-cholesterol bilayers," *Biophysical Journal*, vol. 72, no. 3, pp. 1264-1277, 1997.
- [28] T. Ngawhirunpat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, P. Akkaramongkolporn, U. Ruktanonchai, and P. Supaphol, "Development of meloxicam-loaded electrospun polyvinyl alcohol mats as a transdermal therapeutic agent," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 14, no. 1, pp. 70-79, 2009.
- [29] S. Vemuri and C. T. Rhodes, "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review," *Pharmaceutica Acta Helveticae*, vol. 70, no. 2, pp. 95-111, 1995.
- [30] D. D. Verma, S. Verma, G. Blume, and A. Fahr, "Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 258, no. 1-2, pp. 141-151, 2003.
- [31] J.-Y. Fang, T.-L. Hwang, Y.-L. Huang, and C.-L. Fang, "Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 310, no. 1-2, pp. 131-138, 2006.
- [32] E. Chain and I. Kemp, "The isoelectric points of lecithin and sphingomyelin," *Biochemical Journal*, vol. 28, no. 6, pp. 2052-2055, 1934.
- [33] G. M. El Maghraby, B. W. Barry, and A. C. Williams, "Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 34, no. 4-5, pp. 203-222, 2008.
- [34] G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, "Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin?" *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 58, no. 4, pp. 415-429, 2006.
- [35] G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, "Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 51, no. 10, pp. 1123-1134, 1999.
- [36] J. Cladera, P. O'Shea, J. Hadgraft, and C. Valenta, "Influence of molecular dipoles on human skin permeability: use of 6-ketocholestanol to enhance the transdermal delivery of bacitracin," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 92, no. 5, pp. 1018-1027, 2003.
- [37] V. Dubey, D. Mishra, and N. K. Jain, "Melatonin loaded ethanolic liposomes: physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 67, no. 2, pp. 398-405, 2007.



## Effect of Edge Activator on Characteristic and in Vitro Skin Permeation of Meloxicam Loaded in Elastic Liposomes

Sureewan Duangjit<sup>a</sup>, Praneet Opanasopit<sup>b</sup>, Theerasak Rojanarata<sup>c</sup> and Tanasait Ngawhirunpat<sup>d</sup>

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchan Palace campus, Muang, Nakhon Pathon 73000, Thailand

<sup>a</sup>dsureewan@hotmail.com, <sup>b</sup>praneet@su.ac.th, <sup>c</sup>teerasak@su.ac.th, <sup>d</sup>tanasait@su.ac.th

**Keywords:** Liposome; Transfersome; Skin Permeation; Meloxicam; Surfactant; Edge Activator

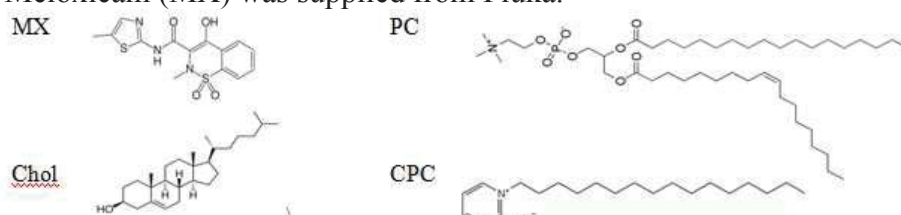
**Abstract.** The aim of this study was to prepare and investigate the potential use of liposomes in the transdermal drug delivery of meloxicam (MX). The vesicles containing a constant amount of MX, phosphatidylcholine (PC), cholesterol (Chol) and cetylpyridinium chloride (CPC) (1:5:1:1 MX/PC/Chol/CPC molar ratio) to obtain liposomes. MX loaded liposomes were investigated for particle size, zeta potential, entrapment efficiency (%EE) and *in vitro* skin permeation. The results indicated that the liposomes were spherical in structure, 77 to 100 nm in size and charged. The %EE of MX in the vesicles ranged from 55 to 56%. The elastic liposomes consisting of MX/PC/Chol/CPC provided a significantly higher skin permeation of MX compared to the other formulations. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis indicated that the application of liposomes may disrupt the stratum corneum lipid. Our research suggests that MX loaded elastic liposomes can be potentially used as a transdermal drug delivery system.

### Introduction

Liposomes are the lipid-based delivery system. Liposomes have been extensively evaluated as vesicles for topical drugs because liposomes are small, spherical vesicles consisting of phospholipids which form bilayers similar to those found in biomembranes. It is recognized that liposomes are able to improve skin penetration enhancement of an active drug by a diversity of mechanism, e.g. the free drug mechanism, the penetration enhancing process of the liposome components, vesicle adsorption to and/or fusion with the stratum corneum and intact vesicle penetration into and through the intact skin [1]. It is established that transfersomes are the first generation of elastic liposomes which were introduced by Ceve's group. Elastic liposomes are prepared from phospholipids and edge activators. The edge activators are often the single chain surfactant with a high radius of curvature which destabilizes the lipid bilayers and increases the deformability of the bilayers of the vesicles. The edge activators are including sodium cholate, stearylamine, Span 60, Span 80, Tween 60, and Tween 80. Transfersomes are known that can improve skin penetration of various drugs [2, 3]. Meloxicam (MX) (Fig. 1) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) used for controlling inflammation, pain and swell in rheumatic diseases. MX is soluble in organic solvent, but practically insoluble in water [4]. Therefore, it would be beneficial to improve skin penetration of MX which has low skin permeability. In this study, meloxicam loaded in elastic liposomes with edge activator were prepared and investigated for their potential use in the transdermal drug delivery.

## Materials and Methods

**Materials.** Phosphatidylcholine (PC) from eggs was purchased from GmbH. Cholesterol (Chol) was purchased from Carlo Erba Reagenti. Cetylpyridinium chloride (CPC) were purchased from Sigma-Aldrich. Meloxicam (MX) was supplied from Fluka.



**Fig. 1** The chemical structure of meloxicam and the lipid compositions of the liposomes.

**Preparation of meloxicam loaded vesicles.** Vesicles (liposomes, elastic liposomes) containing a controlled amount of MX, PC, Chol and CPC were formulated. The sonication method was used to prepare different formulations; they were composed of bilayer-forming MX, PC, Chol and CPC in Table 1. The MX, PC, Chol and CPC were each briefly dissolved in chloroform:methanol (2:1 v/v). In preparing MX loaded vesicles, the materials were deposited in a test tube, and the solvent was evaporated with nitrogen gas. The lipid film was placed in a desiccator for 6 h to remove the remaining organic solvent. The dried lipid film was hydrated with Tris buffer. Following hydration, the dispersion was sonicated in a bath for 30 min and then probe-sonicated for 2 cycles of 30 min.

**Table 1.** The lipid compositions of the different formulations used in study

Name (molar ratio)	Composition (%W/V)				
	MX	PC	Chol	CPC	PBS pH 7.4
Liposome: MX/PC/Chol (1:5:1)	0.07	0.77	0.07	-	100 ml
Elastic liposomes: MX/PC/CPC/Chol (1:5:1:1)	0.07	0.77	0.07	0.07	100 ml

**Characterization of meloxicam loaded vesicles.** The particle size and zeta potential of the vesicles were determined by a Zetasizer Nano series. Transmission Electron Microscopy (TEM) was used to visualize the liposomal vesicles.

**Entrapment efficiency (%EE).** The concentration of MX in the formulation was determined by HPLC analysis after disruption of the vesicles with Triton<sup>®</sup> X-100 (0.1% w/v). The vesicles/Triton<sup>®</sup> X-100 solution was centrifuged at 10,000 rpm at 4°C for 10 min. The supernatant was filtered with a 0.45 µm nylon syringe filter. The %EE of the MX loaded in the formulation was calculated by Eq. 1. Where  $C_L$  is the concentration of MX loaded in the formulation as described in the above methods and  $C_i$  is the initial concentration of MX added into the formulation.

$$\% \text{ entrapment efficiency} = (C_L/C_i) \times 100. \quad (1)$$

**In vitro skin permeation study.** Shed snake skin (*Naja kaouthia*) was used as a membrane for the skin permeation study. The skins were mounted between the two half-cells of a side-by-side diffusion chamber with a 32 °C water jacket. The receptor chamber was filled with 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) and stirred with a star-head Teflon<sup>®</sup> magnetic bar driven by a synchronous motor. At time intervals of 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 h, a 0.5 mL aliquot of receptor was withdrawn, and the same volume of fresh medium was added back into the chamber. The concentration of MX in the samples was analyzed by HPLC using C18 column. The mobile phase was a mixture of potassium dihydrogen phosphate pH 4.4, methanol, and acetonitrile at a ratio of 45:45:10 (v/v/v). A 100 µL injection volume was used with a flow rate of 1.0 mL/min, and UV detector was used at the wavelength of 364 nm.

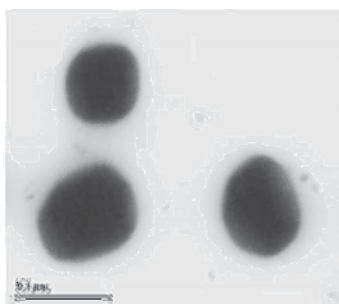
**FT-IR and DSC analysis of shed snake skin.** Following the skin permeation study, the skin was washed with water, blotted dry by keeping in the desiccator for 24 h. The spectrum of the skin was recorded in the range of 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  using a FT-IR spectrophotometer. In the DSC study, the skin sample (2 mg) was weighed into an aluminum seal pan. The samples were heated from 0 to 300 °C at a heating rate of 10 °C/min. All DSC measurements were collected under a nitrogen atmosphere with a flow rate of 100 mL/min.

## Results and Discussion

**Physicochemical characteristics of vesicles.** The particle size for the vesicles was 77 to 100 nm and the zeta potential was negative for MX/PC/Chol and positive for MX/PC/Chol/CPC due to the net charge of the lipid composition in the formulations (Table 2). The edge activator used, CPC, was a cationic surfactant, therefore a positive charge in MX/PC/Chol/CPC was observed. The morphology of the two-dimensional vesicles was further evaluated by TEM. MX loaded in liposomes was spherical in shape (Fig. 2). The %EE of MX in the vesicles ranged from 55 to 56% which were not significantly different (Fig. 3). These results indicated that the edge activator affected the particle size and charge of the vesicles, but not the %EE of MX in the vesicle formulations.

**Table 2.** Particle size and zeta potential in various formulations

Name	Particle size [nm]	Zeta potential [mV]	Entrapment efficiency [%]
MX/PC/Chol	100.3 ± 0.6	-23.5 ± 0.2	56.38 ± 0.33
MX/PC/Chol/CPC	77.1 ± 0.4	+34.5 ± 1.6	55.77 ± 0.61



**Fig. 2** Visualization of MX loaded in liposomes (MX/PC/Chol) (30,000X).

**In vitro skin permeation study.** Fig. 3 illustrates the flux of MX suspensions (control) and MX loaded vesicles. The cumulative amount of drug tended to increase with time after a short lag time (0.5-0.8 h) (data not shown). The flux of drug permeated through the skin in all vesicle formulations was significantly higher than the MX suspensions. The vesicle systems were able to improve skin permeation of an active drug by a diversity of mechanisms [1]. Moreover, the small size in nanometer range of the vesicles and the similar predominance to the lipid bilayer of biological membranes may be also influence [5]. The flux of drug permeated through the skin in transfersomes was higher than in liposomes. Because transfersomes are composed of PC and surfactants, it can squeeze through the pores in the SC and it can also adsorb onto or fuse with the SC, and the intact transfersomes can penetrate into and through the intact skin. Both PC and surfactant were key factors. Surfactants are enhancers that also have the potential to solubilize the lipid within the SC by disruption and fluidization of the SC lipid. This result suggested that the vesicle system can overcome the barrier function of the SC by their physicochemical properties and various mechanisms.

**Characterization of the skin.** The FT-IR spectrum of the snake skin provided a measure of fluidity of the SC lipid. The comparison of the spectral profile of the treated skin with MX suspension and the vesicles formulations resulted in shifts to lower frequencies. There was an transmittance broadening for both the C-H (CH<sub>2</sub>) asymmetric stretching peak near 2920 cm<sup>-1</sup> and the C-H (CH<sub>2</sub>) symmetric stretching peak near 2850 cm<sup>-1</sup> (Fig. 4A) [6]. In addition, the disruption of the SC lipid by the application of vesicles was further investigated by DSC (Fig. 4B). The SC lipid exists as a solid gel at temperature of 230°C. When the skin was treated with vesicles, their melting point (T<sub>m</sub>) shifted as follows: MX/PC/Chol, 228.8 °C and MX/PC/Chol/CPC, 228.2 °C. The data suggested that the change into lower transition temperature demonstrates an increase in the gross fluidity of the SC lipids. These results were in accordance with skin penetration data showing that vesicles increased the skin permeation of MX. The vesicles may be used as alternative carriers for transdermal drug delivery

potential because they interact with solid gel phase SC lipids and thus leading to disruption and fluidization of the SC lipid.

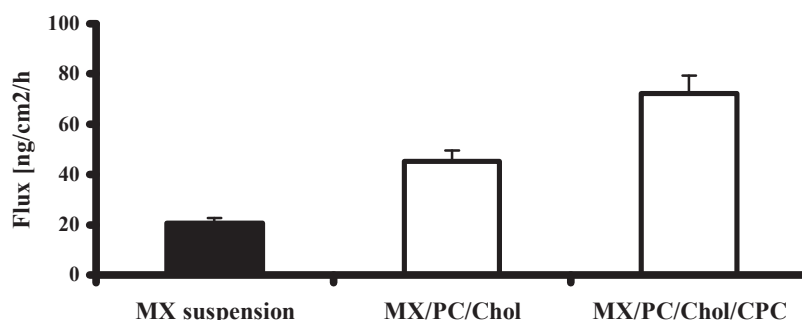


Fig. 3. The flux of drug permeated through the skin of (■) MX suspension (control) and (□) liposomes formulation. Each value represents the mean  $\pm$  SD. (n=3-6)

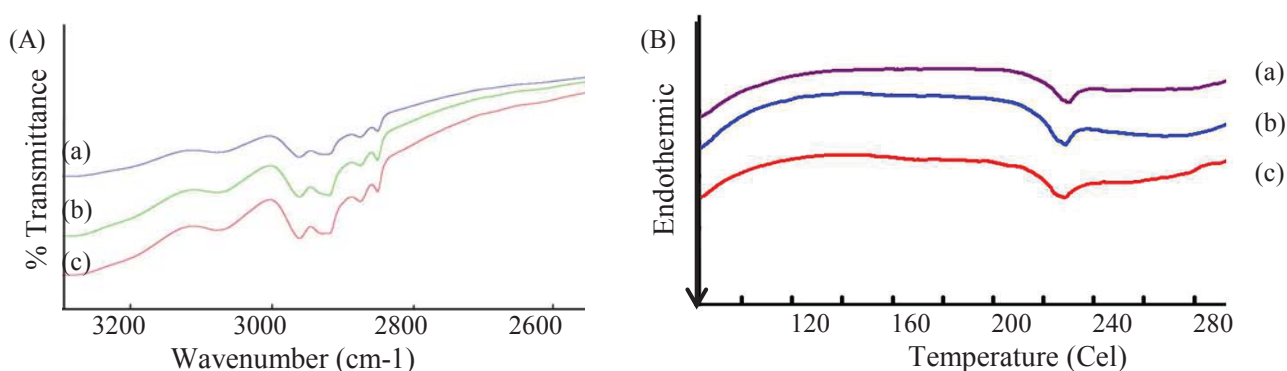


Fig. 4 (A) FT-IR spectra profile and (B) DSC thermogram of shed snake skin after 24 h vesicles skin permeation. (a) MX suspension (control), (b) MX/PC/Chol and (c) MX/PC/Chol/CPC. (B) DSC thermogram of shed snake skin after 24 h vesicles skin permeation.

## Summary

The elastic liposomes consisting of MX/PC/Chol/CPC provided a significantly higher skin permeation of MX compared to the other formulations. The edge activator affected the particle size and charge of the vesicles, and also enhanced the skin permeation of MX. Our research suggests that MX loaded elastic liposomes can be potentially used as a transdermal drug delivery system.

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (*Grant No. PHD/0141/2550*), and Research Career Development Grant (RSA 5280001).

## References

- [1] G.M. El Maghraby, B.W. Barry and A.C. Williams: *Eur. J. Pharm.* Vol. 34 (2008), p. 203
- [2] A.R. Mohammed, N. Weston and A.G.A. Coombes: *Int. J. Pharm.* Vol. 285 (2004), p. 23
- [3] M.M.A. Elsayed, O.Y. Abdallah, V.F. Naggar: *Int. J. Pharm.* Vol. 322 (2006), p. 60
- [4] T. Ngawhirunpat, P. Opanasopit and T. Rojanarata: *Pharma. Dev. Tech.* Vol. 14 (2009), p. 70
- [5] Y.P. Fang, Y.U. Tsai and P.C. Wu: *Int. J. Pharm.* Vol. 356 (2008), p. 144.
- [6] V. Dubey, D. Mishra and N.K. Jai: *Eur. J. Pharm.* Vol. 67 (2007), p. 398

ORIGINAL ARTICLE

# Cremophor RH40-PEG 400 microemulsions as transdermal drug delivery carrier for ketoprofen

Tanasait Ngawhirunpat, Narumon Worachun, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, and Suwannee Panomsuk

*Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand*

## Abstract

The aim of this study was to prepare novel microemulsion for transdermal drug delivery of ketoprofen (KP). The microemulsion composed of ketoprofen as model drug, isopropyl myristate (IPM) as oil phase, surfactant mixture consisting of polyoxyl 40 hydrogenated castor oil (Cremophor RH40) as surfactant and polyethylene glycol 400 (PEG400) as co-surfactant at the ratio 1:1, and water were prepared. The viscosity, droplet size, pH, conductivity of microemulsions, and skin permeation of KP through shed snake skin were evaluated. The particle size, pH, viscosity and conductivity of microemulsions were in the range of 114–210 nm, 6.3–6.8, 124–799 cPs and 1–45  $\mu$ S/cm, respectively. The ratio of IPM, and surfactant mixture played the important role in the skin permeation of KP microemulsions. As the amount of surfactant mixture and IPM increased, the skin permeation of KP decreased. The formulation composed of 30% IPM, 45% surfactant mixture and 25% water showed the highest skin permeation flux. The incorporation of terpenes in the 2.5% KP microemulsions resulted in significant enhancement in skin permeation of KP. The rank order of enhancement ratio for skin permeation enhancement of terpenes was  $\alpha$ -pinene > limonene > menthone. The results suggested that the novel microemulsion system containing IPM, water, Cremophor RH40:PEG400 and terpenes can be applied for using as a transdermal drug delivery carrier.

**Keywords:** Microemulsions, Ketoprofen, Terpenes, Skin permeation

## Introduction

Ketoprofen (KP), a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), has been utilized for the treatment of rheumatoid arthritis and related diseases. However, it has adverse side effects including gastrointestinal irritation when administered per oral. One promising method to reduce its adverse effect is to deliver the drug through the skin. KP has log partition coefficient = 3.11, and aqueous solubility = 0.185 mg/ml, therefore, its properties are appropriate for transdermal delivery. Various methods have been attempted to enhance the delivery of KP through the skin such as liposomes, incorporation of penetration enhancer, microneedles, transdermal patches, and microemulsions.<sup>[1–4]</sup>

Microemulsion is a promising tool for transdermal drug delivery as it has favourable properties such as easy formation, optical isotropy and thermodynamically stable transparent systems. Its composition is oil,

surfactant and water. It is frequently in combination with a co-surfactant with a droplet size usually in the range of 20–200 nm. They can be classified as oil-in-water (o/w), water-in-oil (w/o) or bicontinuous systems depending on their structure. Researchers have been studied about the skin permeation enhancement of drugs by microemulsions. Sakeena et al<sup>[5]</sup> reported that the skin permeation of KP by microemulsion was higher than that of conventional commercial gels of KP. Although various systems to prepare microemulsions for transdermal drug delivery were reported in the literature,<sup>[6–8]</sup> the novel system for preparation of microemulsions is still important to investigate for an effective drug delivery carrier.

The aim of this study was to prepare microemulsion for transdermal drug delivery of KP. The formulations composed of KP, isopropyl myristate (IPM), polyoxyl 40 hydrogenated castor oil (Cremophor RH40), polyethylene glycol 400 (PEG400), terpenes and water were prepared.

*Address for Correspondence:* Tanasait Ngawhirunpat, Ph.D, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand. Tel:66-34-255800. Fax: 66-34-255801. E-mail: tanasait@su.ac.th

(Received 11 August 2011; revised 08 September 2011; accepted 10 September 2011)



Their viscosity, droplet size, pH, conductivity, and skin permeation of KP were evaluated. The effect of content of oil (IPM), surfactant mixture (Cremophor RH40 and PEG400), and three terpenes (limonene,  $\alpha$ -pinene and menthone) incorporated in microemulsions on the physical properties of microemulsions and skin permeation of KP was also investigated.

## Materials and methods

### Materials

Cremophor RH40 was purchased from NOF corporation (Osaka, Japan). IPM and PEG400 were purchased from Fluka chemie AG (Seelze, Germany). KP, indomethacin, limonene,  $\alpha$ -pinene and menthone were obtained from Sigma chemical company (St. Louis, MO, USA). All other chemical and solvent were commercially available and analytical reagent grade. The chemical structure of KP is illustrated in Figure 1.

### Construction of pseudo-ternary phase diagram

IPM was used as the oil phase. Surfactant mixture composed of Cremophor RH40 as the surfactant, and PEG400 as the co-surfactant (C). The ratio of surfactant and co-surfactant used was 0.5:1, 1:1, 1:2 and 1:3. Pseudo-ternary phase diagrams were constructed using water titration method at ambient temperature. The mixture of IPM and surfactant mixture was prepared at weight ratios of 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1, respectively. These mixtures were titrated dropwise with water under magnetic stirring. After being equilibrated, the systems were visually characterized. Transparent fluid systems were characterized as microemulsion. Based on these pseudo-ternary phase diagram, the KP-loaded microemulsion formulations were selected from surfactant mixture at the ratio of 1:1. The compositions of KP microemulsion are shown in Table 1. In order to improve the skin permeation of KP, the microemulsion formulation resulted in the highest skin permeation was selected to

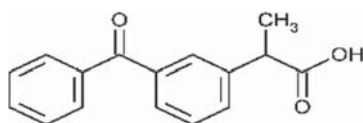


Figure 1. The structure of ketoprofen.

Table 1. Composition of the microemulsion formulations.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
IPM	20	20	20	30	30	30	40	40	40	30	30	30
Cremophor RH 40	22.5	25	27.5	22.5	25	27.5	22.5	25	27.5	22.5	22.5	22.5
PEG 400	22.5	25	27.5	22.5	25	27.5	22.5	25	27.5	22.5	22.5	22.5
Water	32.5	27.5	22.5	22.5	17.5	12.5	12.5	7.5	2.5	22.5	22.5	22.5
Ketoprofen	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Limonene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
$\alpha$ -pinene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-
Menthone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5

be incorporated with three selected terpenes (limonene,  $\alpha$ -pinene, and menthone) at the concentration of 5%w/w, and their skin permeation of KP were evaluated.

### Evaluation of microemulsions

#### Centrifugation

Thermodynamic stability of the microemulsions was evaluated by ultracentrifugation (Optima L-80, Beckman Instruments, USA) at 40,000 rpm for 30 min at 4°C.

#### Conductivity measurements

The electrical conductivity of the microemulsions was determined using conductivity meter (EC Testr 11+, USA) at 25°C. The measurements were performed in triplicate.

#### Viscosity measurements

The viscosity of microemulsions was measured using a Brookfield DV-III ULTRA rheometer (Brookfield Engineering Laboratories, USA) fitted with a CP-52 spindle. Brookfield Rheocalc operating software was used to control the rheometer. The sample cup temperature was controlled to 25°C by circulating water bath. The measurements were performed in triplicate.

#### Particle size measurements

The droplet size of the microemulsion formulations was measured using photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nano series, Malvern, USA). The measurement was performed using a He-Ne laser at 633 nm with clear disposable zeta cell. The measurements were performed in triplicate.

#### Skin permeation studies

Shed snake skin of *Naja kaouthia* was used as a model membrane because it was reported to be similar in permeability with human skin.<sup>[9]</sup> It was donated by the Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand. The post-shed whole skin of these snakes was kept immediately. The shed snake was obtained from 5–7 different snakes. Each snake skin can be divided into 10–12 pieces. The thickness of shed snake skins was about 0.02–0.03 mm. It was stored at –10°C prior to use. After thawing, the skin was cut to a round section of 1 inch<sup>2</sup> and was then immediately placed on the diffusion cell. The skin sample was mounted between two half-cells of Franz diffusion cell (6.0 mL volume and

2.31 cm<sup>2</sup> effective diffusion area, MatTek Corporation, USA) with a water jacket connected to a water bath at 32°C. The dorsal surface of skin was placed in contact with the KP loading microemulsion formulations. The receiver was filled with phosphate buffer pH 7.4 (PBS) and stirred at 1,200 rpm with magnetic bar. A part of the receiver solution (1 mL) was collected at 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h, respectively, and the same volume of PBS was replaced to keep the volume constant. 2.5% KP dissolved in polyethylene glycol 400 (PEG400): water at the ratio 7:3 was used as the control vehicle. The samples were stored at 4°C until analysis. The cumulative amount of KP was plotted against time, and the pseudo-steady state flux ( $J_s$ , between 4–12 h) was determined from the slope of linear regression analysis. The intercept on the X-axis was determined as the lag time ( $T_L$ , h). In order to evaluate effect of permeation enhancer, the enhancement ratio (ER) was determined by equation 1

$$ER = \frac{\text{Flux from formulation with enhancer}}{\text{Flux from formulation without enhancer}} \quad (1)$$

### HPLC analysis

A Perkin Elmer Series 2000 HPLC (Perkin Elmer, USA) was used to quantify the amount of KP. Chromatographic separation of KP was achieved using a symmetry C18 column (Water, USA, particle size=5 µm; column dimension=4.6 × 150 mm) operating at 1 ml min<sup>-1</sup>. The mobile phase composed of 0.1% (v/v) phosphoric acid: methanol (25:75, v/v) was used. Indomethacin was as an internal standard. The injection volume was 20 µl, and UV detector was set at 254 nm, respectively. All of the sample solutions were filtered through a polytetra fluoroethylene (PTFE) filter (average pore size=0.45 µm) prior to injection. The calibration curve for KP was in the range of 1–50 µg ml<sup>-1</sup> with the correlation coefficient of 0.999. The intra-day and inter-day percent relative standard deviation (%RSD) were in the range of 0.05–0.18%.

### Statistical analysis

All experimental measurements were triplicately performed. Result values were expressed as mean value ± standard deviation (SD). Statistical significance of differences in steady state flux was examined using analysis of variance (ANOVA) with *post hoc* test.

## Results and discussion

### Determination of pseudo-ternary phase diagram

It has been reported IPM gave a good solubility and relatively high skin permeation enhancement of KP.<sup>[7]</sup> Cremophor RH40 and PEG 400 were used as surfactant and co-surfactant, respectively as their high solubilizing properties for KP.<sup>[10]</sup> The increment of drug solubility by lipid-based formulations can enhance the skin penetration. Therefore, IPM, surfactant mixture of Cremophor RH40 and PEG400, and water were combined to develop microemulsion formulation. Figure 2 shows the pseudo-

ternary phase diagrams with various weight ratios of surfactant mixture. The shaded area refers to the translucent microemulsion region, whereas the outside of the region indicates turbid regions. From Figure 2, The largest microemulsion region was observed in the system composed of surfactant mixture at the ratio of 1:1 (Figure 2b), and these area decreased in size when the ratio of surfactant mixture was decreased to 0.5:1 (Figure 2a) or increased to 1:2 (Figure 2c) and to 1:3 (Figure 2d). Huang et al also reported that the isotropic region tended to narrow down with increasing S:C ratios in the oil-poor part of pseudo-ternary phase diagram.<sup>[11]</sup> All microemulsion formulations were clear liquids. No phase separation was observed after ultracentrifugation at 4°C. The pseudo-ternary phase diagram of microemulsion at surfactant mixture at the ratio of 1:1 were selected to be loaded with KP.

### Physicochemical properties of KP-loaded microemulsions

The physicochemical parameters of the KP-loaded microemulsions are shown in Table 1. The droplet size of microemulsion was in the nano-size range (114–210 nm). The pH of microemulsion was between 6.3 and 6.8. Incorporation of KP slightly decreased the pH of the microemulsion due to weak acid property of KP. The viscosity of microemulsion was in the range of 124–733 cPs, and tended to increase as the amount of surfactant mixture increased. It might be that the hydrophilic chain of nonionic surfactant are strongly hydrated and connected together with hydrogen bonds allowing strong interaction.<sup>[12]</sup> The electrical conductivity of microemulsion formulations was in the range of 1–45 µS/cm. The electrical conductivity of microemulsions increased by the increasing the amount of water. The increase in electrical conductivity might be caused from the increase in dissociation of surfactant as a function of water content. It has been previously reported that the conductivity of w/o microemulsions was at lower than 10 µS/cm, and the o/w microemulsion have relatively high conductivity as compared with w/o microemulsions (about 10–100 µS/cm).<sup>[13–14]</sup> Therefore, F3, F6, F8 and F9 could be classified as w/o microemulsion, whereas the others were o/w microemulsion.

### Skin permeation studies

*In vitro* skin permeation of KP microemulsions through shed snake skin were performed. Figure 3 represents skin permeation profiles of KP in selected microemulsion formulation (F4, F10, F11, F12). The cumulative amount of KP in the receiver chamber increased linearly with time, and lag time was about 3 h. This linear accumulation was also observed in other profiles for microemulsions (data not shown). The flux of KP in the steady state calculated from permeation profiles of KP are shown in Table 2. The flux of the control solution was significantly lower than all microemulsion formulations. Various mechanisms for skin permeation enhancement of permeants by microemulsions have been proposed. Firstly, microemulsions act as drug



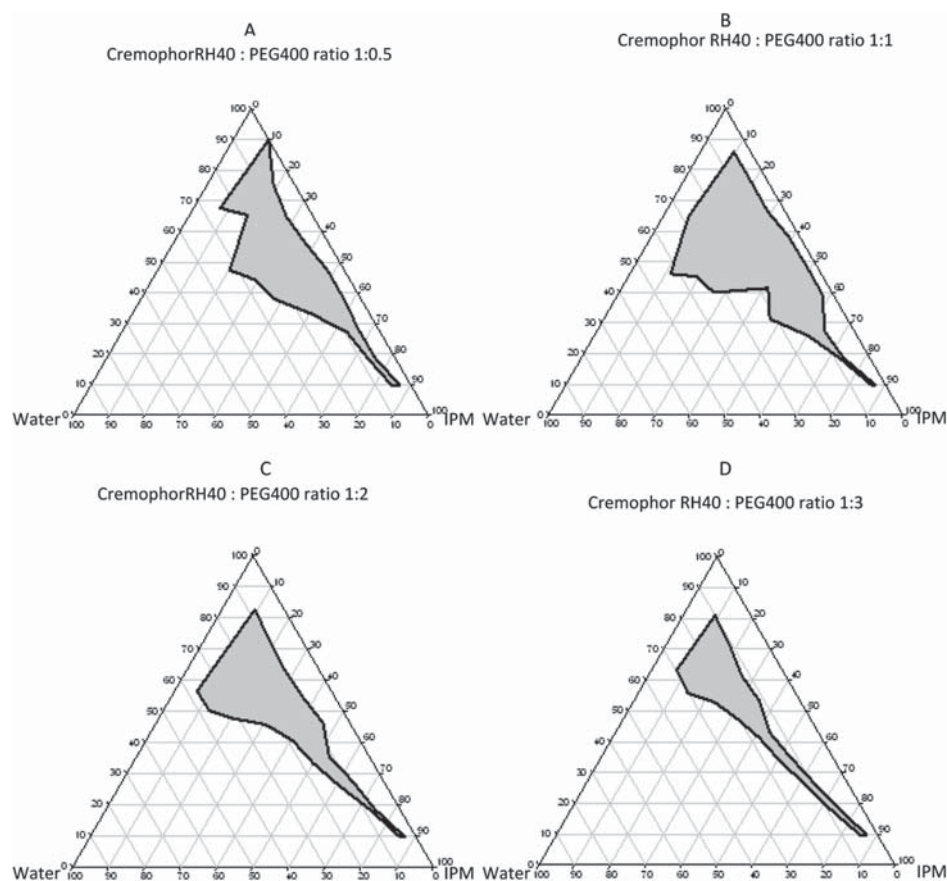


Figure 2. Pseudo-ternary phase diagram of microemulsion composed of isopropyl myristate, surfactant (Cremophor RH40), co-surfactant (PEG400) and water at various surfactant: co-surfactant ratio; 1:0.5 (a), 1:1 (b), 1:2 (c), 1:3 (d). The shade area is the microemulsion region.

reservoirs where loaded drug is released from the inner pseudophase to the outer pseudophase and finally further into the outer. Secondly, microemulsion droplets might breakdown on the surface of stratum corneum and then release their content into skin. Thirdly, skin permeation of loaded drug occurs directly from the microemulsion droplets to the stratum corneum without microemulsion fusion at the stratum corneum. The last mechanism has been frequently supported by findings of other groups and indicates that the enhancement effect of microemulsion is caused by the nano-sized droplets dispersed in continuous phase which can move easily into the stratum corneum and carry the drug through the skin barrier.<sup>[6,15]</sup>

As the amount of IPM was fixed into 20–40% and the amount of surfactant mixture (Cremophor RH40 and PEG400) increased from 45% to 55% (Figure 4), the skin permeation flux had a trend to decrease, except in F1. KP is a practically water insoluble drug but very soluble in the surfactant mixture.<sup>[10]</sup> The thermodynamic activity of the drug in the microemulsion at the lower concentration of surfactant mixture was a significant driving force for the skin permeation of the drug. Therefore, the increase in content of surfactant mixture in microemulsion might decrease the skin permeation of drug.<sup>[7,16]</sup>

IPM significantly affected the skin permeation flux of microemulsion formulations. As the content of surfactant

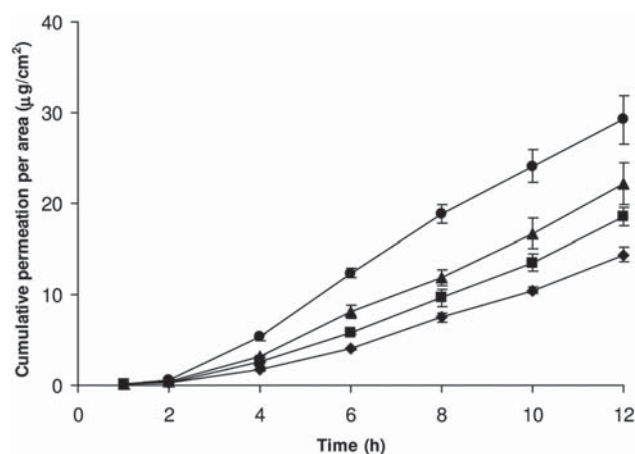


Figure 3. The permeation profile of ketoprofen from ketoprofen microemulsions (●) F4, (■) F12, (▲) F10, and (○) F11 through shed snake skin. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three to five experiments.

mixture was fixed to 40–55% and the content of IPM increased from 20% to 40%, the skin permeation flux significantly decreased, except in F1. IPM enhances skin permeation by acting as a fluidizer of intercellular lipids, and affects the lipid-rich phase in the stratum corneum, thereby reducing its barrier function.<sup>[17]</sup> However, the

higher content of IPM resulted in the higher solubility of KP. The thermodynamic activity of KP in microemulsion at the higher content of IPM was lower than that at the lower content. Therefore, the driving force for the skin permeation of KP of microemulsion at the higher concentration of IPM was lower than the lower content of IPM. The highest skin permeation of KP was observed in the formulation F4 (30% IPM, 45% surfactant mixture and 25% water). These results suggested a suitable composition for formulation of microemulsion with high skin permeation enhancement. F4 was also selected to study the effect of drug loading and effect of terpenes in microemulsion.

Compared between conductivity and the flux of KP at the same content of IPM and/or surfactant mixture, it

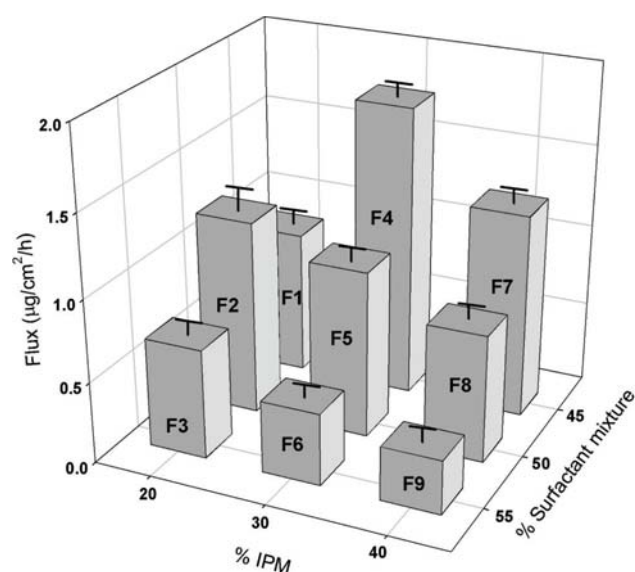


Figure 4. The effect of amount of surfactant mixture and isopropyl myristate on the flux of ketoprofen through shed snake skin from ketoprofen microemulsions. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three to five experiments.

is observed that the flux of w/o microemulsion was significantly lower than o/w microemulsion. Podlogar et al<sup>[1]</sup> reported that the o/w microemulsions provided higher membrane fluxes of diclofenac diethylamine and KP than the w/o microemulsions. According to the permeation of drug-loaded microemulsion droplets attributed to the permeation enhancement effect, the oil droplets of the o/w type might permeate into the epidermis easier than the water droplets of the w/o type at the same surfactant concentration owing to the lipophilic nature of the stratum corneum bilayer, perturb it by creating separate domains, and induce highly permeable pathways in the stratum corneum. In addition, a hydrophobic drug is preferentially encapsulated in the oil droplet and the highly drug-loaded droplets favor partitioning into the epidermis, resulting in the higher flux.<sup>[6]</sup> Moreover, it might be that the stronger interaction between microemulsion components in w/o microemulsion led to slower KP released from the formulation and permeated through the skin.<sup>[1]</sup>

The percutaneous penetration flux of KP increased with the addition of terpene ( $\alpha$ -pinene, limonene, menthone) in the microemulsion (Figure 3, Table 2). The presence of terpene enhancers (F10-F12) produced a 1.3- to 2.0-fold flux increase over the formulation without any terpene (F4). The possible mechanism of terpenes in skin disruption may be due to the lipid fluidizing activity of terpenes.<sup>[18]</sup> It has been reported that terpenes extract lipids from stratum corneum resulting in disorder of lipid domains.<sup>[18-19]</sup> The flux was increased with terpenes incorporated in the formulation. The ER could be ranged in the following order: F11,  $\alpha$ -pinene (ER=2.1) > F10, limonene (ER=1.6) > F12, menthone (ER=1.3). Our results were consistent with Bilek et al<sup>[20]</sup> that the ER of  $\alpha$ -pinene for KP in ethanolic solution was higher than limonene. The differences in permeation enhancement ratio of various terpenes may be attributed to the presence of different terpenes with variable molecular weight and boiling points. The higher enhancement of  $\alpha$ -pinene and limonene may

Table 2. Characteristics and permeation parameter of KP microemulsion formulations.

Formulations	Particle size (nm)	pH	Conductivity ( $\mu$ S/cm)	Viscosity (cPs)	Flux ( $\mu$ g/cm <sup>2</sup> /h)	Lag time (h)
2.5% KP in 70% PEG400:30% water	-	-	-	-	0.062 $\pm$ 0.005	1.51 $\pm$ 0.22
F1	114.73 $\pm$ 3.79	6.76 $\pm$ 0.01	45.12 $\pm$ 0.02	799.31 $\pm$ 0.95	1.28 $\pm$ 0.02*	2.85 $\pm$ 0.11
F2	206.13 $\pm$ 9.62	6.71 $\pm$ 0.02	33.10 $\pm$ 0.01	592.25 $\pm$ 1.66	1.02 $\pm$ 0.08*	2.95 $\pm$ 0.12
F3	207.47 $\pm$ 17.46	6.55 $\pm$ 0.02	9.83 $\pm$ 0.01	261.05 $\pm$ 2.53	0.57 $\pm$ 0.06*	3.24 $\pm$ 0.14
F4	186.40 $\pm$ 5.62	6.35 $\pm$ 0.02	35.50 $\pm$ 0.02	722.02 $\pm$ 8.16	1.73 $\pm$ 0.10*	3.09 $\pm$ 0.17
F5	152.27 $\pm$ 11.50	6.47 $\pm$ 0.01	23.30 $\pm$ 0.01	511.48 $\pm$ 3.31	0.98 $\pm$ 0.05*	2.95 $\pm$ 0.12
F6	143.68 $\pm$ 3.41	6.29 $\pm$ 0.01	7.50 $\pm$ 0.02	201.11 $\pm$ 1.66	0.44 $\pm$ 0.03*	3.21 $\pm$ 0.12
F7	123.40 $\pm$ 3.75	6.77 $\pm$ 0.02	13.20 $\pm$ 0.01	460.74 $\pm$ 0.95	1.01 $\pm$ 0.02*	3.05 $\pm$ 0.15
F8	193.33 $\pm$ 12.76	6.70 $\pm$ 0.01	3.25 $\pm$ 0.01	223.72 $\pm$ 1.66	0.78 $\pm$ 0.06*	3.32 $\pm$ 0.17
F9	176.40 $\pm$ 5.62	6.55 $\pm$ 0.02	1.02 $\pm$ 0.01	124.02 $\pm$ 8.16	0.31 $\pm$ 0.02*	3.33 $\pm$ 0.21
F10	210.03 $\pm$ 16.56	6.58 $\pm$ 0.01	24.11 $\pm$ 0.06	663.33 $\pm$ 2.52	2.78 $\pm$ 0.06***	2.88 $\pm$ 0.21
F11	198.30 $\pm$ 26.97	6.53 $\pm$ 0.00	25.12 $\pm$ 0.06	666.24 $\pm$ 7.21	3.48 $\pm$ 0.06***	2.66 $\pm$ 0.27
F12	186.80 $\pm$ 16.61	6.44 $\pm$ 0.01	25.65 $\pm$ 0.06	628.30 $\pm$ 5.96	2.28 $\pm$ 0.06***	2.89 $\pm$ 0.13

\* $P$  < 0.05 compared with 2.5% KP in 2.5% KP in 70% PEG400:30% water.

\*\*\* $P$  < 0.05 compared with F4.

be attributed to their low boiling point and molecular weight. The low boiling points of terpenes indicate the weak cohesiveness or self-association of the molecules<sup>[21]</sup>, and therefore they may more easily associate or interact with lipid components of stratum corneum and alter the barrier property. Moreover, our results were consistent with previous reports of Narishetty and Panchagnula<sup>[22]</sup> that for hydrophobic drugs such as indomethacin the lipophilic terpenes such as limonene, terpinene were found to be most effective, whereas for hydrophilic compounds such as 5-fluorouracil and propanolol hydrochloride, the hydrophilic terpenes containing functional moieties with hydrogen bonding ability such as menthone are effective in enhancing skin transport.

The ratio of surfactant mixture and IPM had no effect on lag time of the microemulsion formulations, however, addition of terpenes in the microemulsion formulation slightly decrease the lag time (Table 2). The results were in agreement with previous report of Maghraby<sup>[23]</sup> that the lag time of hydrocortisone was not significantly different in microemulsion formulations. The lag time is a permeation parameter depending mainly on the diffusivity of drug through the skin. However, it does not depend directly on the drug release. Considering this with no significant difference between the lag time values obtained after application of different formulations will further indicate that the skin permeation of drug did not depend on drug release.

## Conclusion

The KP transdermal patched using acrylic matrix terpenes and water has been successfully prepared. The ratio of surfactant mixture played an important role on loading capacity, physicochemical properties and skin permeation of KP. The incorporation of terpene in the microemulsion significantly increased the skin permeation of KP. The highest skin permeation flux was found in the microemulsion consisting of 30% IPM, 45% surfactant, 25% water, and 5%  $\alpha$ -pinene. The results suggested that the novel microemulsion system composed of IPM, Cremophor RH40:PEG400, terpenes and water can be applied for using as an effective transdermal drug delivery carrier.

## Acknowledgements

The authors wish to thank The Thailand Research Funds (Grant No. RSA 5280001) for financial support.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Podlogar F, Bester Rogac M, Gasperlin M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40-Imwitor 308-IPM microemulsions on ketoprofen release. *Int J Pharm* 2005;302:68-77.

- Djordjevic L, Primorac M, Stupar M. *In vitro* release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. *Int J Pharm* 2005;296:73-79.
- So JW, Park HH, Lee SS, Kim DC, Shin SC, Cho CW. Effect of microneedle on the pharmacokinetics of ketoprofen from its transdermal formulations. *Drug Deliv* 2009;16:52-56.
- Shinkai N, Korenaga K, Mizu H, Yamauchi H. Intra-articular penetration of ketoprofen and analgesic effects after topical patch application in rats. *J Control Release* 2008;131:107-112.
- Sakeena MH, Elrashid SM, Muthanna FA, Ghassan ZA, Kanakal MM, Laila L et al. Effect of limonene on permeation enhancement of ketoprofen in palm oil esters nanoemulsion. *J Oleo Sci* 2010;59:395-400.
- Junyaprasert VB, Boonme P, Songkro S, Krauel K, Rades T. Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsions. *J Pharm Pharm Sci* 2007;10:288-298.
- Rhee YS, Choi JG, Park ES, Chi SC. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *Int J Pharm* 2001;228:161-170.
- Tsai YH, Chang JT, Chang JS, Huang CT, Huang YB, Wu PC. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. *J Pharm Sci* 2011;100:2358-2365.
- Ngawhirunpat T, Opanasopit P, Rojanarata T, Panomsuk S, Chanchome L. Evaluation of simultaneous permeation and metabolism of methyl nicotinate in human, snake, and shed snake skin. *Pharm Dev Technol* 2008;13:75-83.
- Mura P, Moyano JR, González-Rodríguez ML, Rabasco-Alvaréz AM, Cirri M, Maestrelli F. Characterization and dissolution properties of ketoprofen in binary and ternary solid dispersions with polyethylene glycol and surfactants. *Drug Dev Ind Pharm* 2005;31:425-434.
- Huang YB, Lin YH, Lu TM, Wang RJ, Tsai YH, Wu PC. Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles. *Int J Pharm* 2008;349:206-211.
- Boonme P, Krauel K, Graf A, Rades T, Junyaprasert VB. Characterization of Microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol." *AAPS PharmSciTech* 2006;7:E1-E6.
- Baroli B, López-Quintela MA, Delgado-Charro MB, Fadda AM, Blanco-Méndez J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxysalen. *J Control Release* 2000;69:209-218.
- Park ES, Cui Y, Yun BJ, Ko IJ, Chi SC. Transdermal delivery of piroxicam using microemulsions. *Arch Pharm Res* 2005;28:243-248.
- Peltola S, Saarinen-Savolainen P, Kiesvaara J, Suhonen TM, Urtti A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. *Int J Pharm* 2003;254:99-107.
- Zhao X, Liu JP, Zhang X, Li Y. Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. *Int J Pharm* 2006;327:58-64.
- Ren C, Fang L, Ling L, Wang Q, Liu S, Zhao L et al. Design and *in vivo* evaluation of an indapamide transdermal patch. *Int J Pharm* 2009;370:129-135.
- Ogiso T, Paku T, Iwaki M, Tanino T. Percutaneous penetration of fluorescein isothiocyanate-dextran and the mechanism for enhancement effect of enhancers on the intercellular penetration. *Biol Pharm Bull* 1995;18:1566-1571.
- Zhao K, Singh J. Mechanism(s) of *in vitro* percutaneous absorption enhancement of tamoxifen by enhancers. *J Pharm Sci* 2000;89:771-780.
- Bilek H, Wonglertnirant N, Ngawhirunpat T, Opanasopit P, Kumpugdee-Vollrath M. Effect of terpenes on the skin permeation of ketoprofen through shed snake skin. *Silpakorn Sci Tech J* 2009; 3(2):34-41.
- Martin A. Diffusion and dissolution. In: Martin A, (ed), *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 1995, Lea & Febiger, Philadelphia, pp 877-898.
- Narishetty ST, Panchagnula R. Transdermal delivery of zidovudine: Effect of terpenes and their mechanism of action. *J Control Release* 2004;95:367-379.
- Maghraby GM. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. *Int J Pharm* 2008;355:285-292.