Thesis Title	The Entrapment of Azelaic Acid and Its Derivatives in Nanoparticles for Pharmaceutical and Cosmetic Uses	
Author	Ms. Atchara Panyosak	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Member
	Prof. Dr. Yongyut Rojanasakul	Member

ABSTRACT

The objective of this study was to entrapped azelaic acid (AA) and its derivatives in liposomes and niosomes for pharmaceutical and cosmetic uses. The hydrophilic property of AA was modified by complexation AA with hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) using physical mixture (PM) and solid inclusion complexation (AACD) by co-evaporation (COE) and freeze-drying (FD). The structure was identified by IR, DSC and XRD. The lipophilic property of AA was improved (diethyl azelate, DA) by esterification with Fischer reaction and identified by IR, MS, and ^{1}H NMR. The transdermal property of AA, AACD and DA were also modified by entrapping in nanovesicles (liposomes and niosomes with the compositon of DPPC, Span 60 and Tween 61) by chloroform film method with sonication. AA and its derivatives both entrapped and not entrapped in nanovesicles were tested for physical and chemical stability at 4, 30 and 45 °C for 3 months and activities (free radical scavenging, tyrosinase inhibition, MTT antiproliferation test in cell lines, SRB assay and anti *P. acne* test by the agar disc inhibition zone, MBC and MIC). AA contents in AACD were analyzed by derivatization and determined by HPLC whereas DA was determined by GC. Transdermal absorption through excised rat skin of AA and its derivatives both entrapped and not entrapped in nanovesicles, by vertical Franz diffusion cell at 32 ±2°C for 12 h was also investigated. The amount of AA and its derivatives in the form of AA were determined in skin strips (stratum corneum) and whole skin (viable epidermis and dermis). All samples were also tested in skin irritation in rabbits according to the EPA health effect test guidelines.

For the result of this study, the identification of inclusion complexes, COE methods gave partial inclusion complexes and exhibited the highest dissolution rate of AA, whereas FD formed complete complexation. The percentage yield of the synthesized DA product was approximately 89% (MW=244). The free radical scavenging activities of DA and AACD against stable free radical DPPH were much less than AA. AACD at equivalent amount of AA showed higher tyrosinase inhibition than AA while DA did not show this activity. AA at 500 μg/μl exhibited the highest anti *P. acne* activity, followed by AA at 250 μg/μl, and 500 μg/μl of DA while AACD did not show the inhibition zones. MIC and MBC of AA with 40 mg/ml were noted against *P. acne* at 1/16 and 1/8 dilutions. In addition, anti *P. acne* test showed MIC and MBC at 1/2 and 1/4 dilutions of DA with 40 mg/ml. AA, DA and AACD were entrapped in liposomes and niosomes comprising of DPPC/cholesterol and Tween61/cholesterol, respectively. The two nanovesicular formulations of DPPC/ cholesterol = 7:3 and Tween61/ cholesterol = 1:1 gave good physical stability. The particle size of these formulations was found to be in the range of 90 to 190 nm. The entrapment efficiency of AA, DA and AACD in all vesicular formulations was more than 80%. The *in vitro* transdermal absorption of AACD from various preparation methods through rat skin was enhanced via complexation with HPβCD. FD method exhibited higher fluxes in the stratum corneum (SC), deeper skin layer (viable epidermis and dermis, VED) and receiver chamber at 30.60±4.78, 28.27±6.16 and 6.03±2.31 μg cm^{-2} h^{-1} respectively, as compared to those of free AA, yielding 22.06±3.24, 26.51±3.20 and 0.38±0.03 μg cm^{-2} h^{-1} respectively. However, AA permeated faster from vesicles containing plain drug than from those containing AACD complexes. The following trend was observed: AA niosomes > AA liposomes > AACD niosomes > AACD liposomes ($p < 0.05$), whereas DA could not be detected in the receiving solution. These results confirmed that the nanovesicles enhanced penetration of AA but retarded penetration of DA and the AACD complex. Anti-proliferative activity of AA, AACD and DA entrapped and not entrapped in vesicles, using MTT assay in three cancer cell lines (HeLa, KB, and $B_{16}F_{10}$) comparing with vincristine, were investigated. AACD showed the highest potency comparing to AA in HeLa, KB and $B_{16}F_{10}$ of 1.48, 1.6 and 1.5 times, respectively. When entrapped in vesicles, DA and AACD were more effective than AA in killing cancer cells. AACD entrapped in liposomes gave the highest anti-proliferation activity in HeLa cell lines with the IC_{50} of 2.3 and 327 times more potent than vincristine and AA, respectively. The cytotoxic effect of AA, AACD and DA and nanovesicular formulations on cell growth was determined with the SRB assay. The cytotoxic effect of AA, DA and AACD including blank liposomes and niosomes was modest compared to the cytotoxic effect of cisplatin on mouse epidermal cell lines (JB6, normal cell lines). Blank liposomes had no growth inhibitory effect on JB6 cells, but the blank niosomes exhibited growth inhibitory effect. The irritation of AA, AACD and DA and nanovesicular formulations on shaved rabbit skin was examined. There were found the sign of very slight erythema from 20 % AA in propylene glycol. In addition, 10% AACD aqueous solution gave the sign of well- defined erythema on shaved rabbit skin. There were no signs of erythema or edema detected from DA formulation and all nanovesicular formulations within 72 h. Therefore, the results from this study have

demonstrated the possible applications of AA and its derivatives when entrapped in nanovesicles for pharmaceuticals and cosmetics, because the increase transdermal absorption, high efficiency and the decrease in allergy of AA were obtained.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเก็บกักอซิลาอิคแอซิดและอนุพันธ์ในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อใช้ทางยาและเครื่องสำอาง
ผู้เขียน	นางสาว อัจฉรา ปัญโญศักดิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร.อรัญญา มโนสร้อย ประธานกรรมการ รศ. ดร.จีรเดช มโนสร้อย กรรมการ ศ. ดร. ยงยุทธ โรจนสกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บกักอซิลาอิคแอซิด (AA) และอนุพันธ์ของมันในอนุภาคขนาดเล็ก (ไลโปโซมและนีโอโซม) เพื่อใช้ในทางยาและเครื่องสำอาง โดยโครงสร้างของ AA ถูกดัดแปลงให้มีสมบัติละลายน้ำเพิ่มขึ้นคือ การทำให้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน(AACD) กับไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (HβPCD) ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งสามารถเตรียมตัวอย่างได้โดยสามวิธีคือ ผสมในสภาวะที่เป็นของแข็ง (PM) ระเหยแห้งร่วม (COE) และทำให้แห้งโดยใช้ lyophilization (FD) แล้วนำสารตัวอย่างที่เตรียมได้พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยอินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (IR), ดิฟเฟอร์เรนเชียลสแกนนิ่งคาลอรีเมตรี (DSC) และเอ็กซ์เรย์ดิเฟอเรนเชียล (XRD) นอกจากนี้โครงสร้างของอซิลาอิคแอซิด ยังถูกดัดแปลงให้ละลายได้ในไขมันเพิ่มขึ้นโดยทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของเอสเทอร์ได้เป็นไดเอทิลอซิเลต (DA) ซึ่งสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาฟิชเชอร์ เอสเทอริฟิเคชัน และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (IR), แมสสเปกโตรสโกปี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกสเปกโตรสโกปี (^{1}H NMR) AA, DA และ AACD ถูกเก็บกักในอนุภาคขนาดเล็ก (ไลโปโซมและนีโอโซม) ที่มีส่วนผสมของดีพีพีซี (DPPC) สแปน60 (Span 60) และทวีน61 (Tween 61) ด้วย chloroform film method จากการศึกษาความคงตัวของ AA และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อนุพันธ์ของมันที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดเล็กที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือนและศึกษาฤทธิ์ต่างๆซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วยวิธี SRB ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Propiniobacterium acne* การซึมผ่านหนังหนูของ AA และอนุพันธ์ของมันที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดเล็กด้วย vertical Franz diffusion cell ที่อุณหภูมิ 32 ±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หาปริมาณของ AA และอนุพันธ์ของมันในชั้นของสตาร์ตัมคอร์เนียม อิพิเดอร์มิสและเดอร์มิส และทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังในสัตว์ทดลองกระต่าย

ในการดัดแปลงโครงสร้างของ AA ให้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (AACD) ด้วยวิธีการต่างๆพบว่าการเตรียมโดยวิธีการระเหยแห้งร่วมเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างไม่สมบูรณ์ระหว่าง AA กับ HβPCD แต่ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ AA ได้สูงสุด ในขณะที่การเตรียมด้วยวิธีการทำให้แห้งโดยใช้ lyophilization AA สามารถเกิดเป็นสารเชิงประกอบเชิงซ้อนกับ HβPCD อย่างสมบูรณ์ ในการดัดแปลงโครงสร้างของ AA ให้ละลายได้ในไขมันเพิ่มขึ้นโดยทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของเอสเทอร์ได้เป็น DA พบว่าสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ 89 % ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH ของ AACD และ DA พบว่าให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า AA แต่ในการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารทั้งสองพบว่า AACD สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่า AA แต่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ใน DA ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acne* พบว่าที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรของ AA ให้ inhibition zone กว้างที่สุด รองลงมาได้แก่ AA ที่ 250 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรและ DA ที่ 500ไมโครกรัม/ไมโครลิตรตามลำดับ แต่ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวใน AACD ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) ต่อ *P. acne* ของ AA เท่ากับ 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า DA ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 20 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ การศึกษาลักษณะทางกายภาพของ AA, DA และ AACD ที่ถูกเก็บกักในไลโปโซมและนีโอโซมที่ถูกเตรียมขึ้นจากส่วนผสมของ DPPC/โคเลสเตอรอลเท่ากับ 7:3 (ไลโปโซม) และ ทวีน61/โคเลสเตอรอลเท่ากับ 1:1 (นีโอโซม) พบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงระหว่าง 90-190 นาโนเมตร สามารถเก็บกัก AA, DA และ AACD ในอนุภาคขนาดเล็กได้มากกว่า 80% การศึกษาการซึมผ่านหนังหนูของ AACD ที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ พบค่าฟลักซ์ของ AA สูงสุดในสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมด้วยวิธีการทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แห้งโดยใช้ lyophilization (FD) ในชั้นสตาร์ตัมคอร์เนียมและหนังหนูชั้นที่ลึกกว่า (ชั้นหนังกำพร้าที่ยังมีชีวิตและชั้นหนังแท้) และ receiver chamber มีค่าเท่ากับ 30.60 ± 4.78, 28.27 ± 6.16 และ 6.03±2.31 ไมโครกรัม/เซนติเมตร^2/ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าฟลักซ์ของสารละลาย AA มีค่าเท่ากับ 22.06 ± 3.24, 26.51 ± 3.20 และ 0.38 ± 0.03 ไมโครกรัม/เซนติเมตร^2/ชั่วโมงตามลำดับ อย่างไรก็ตาม AA ที่ถูกเก็บกักในอนุภาคขนาดเล็กสามารถซึมผ่านหนังหนูได้อย่างรวดเร็ว โดยสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้คือ AA ที่ถูกเก็บกักในนีโอโซม > AA ที่ถูกเก็บกักในไลโปโซม > AACD ที่ถูกเก็บกักในนีโอโซม > AACD ที่ถูกเก็บกักในไลโปโซม ในขณะที่ตรวจไม่พบ DA ใน receiving solution ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุภาคขนาดเล็กช่วยเพิ่มการซึมผ่านหนังหนูของ AA แต่ลดการซึมผ่านหนังหนูของ DA และ AACD ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของ AA, DA และ AACD ทั้งที่ได้เก็บกักและไม่ได้เก็บกักในอนุภาคขนาดเล็กโดยวิธี MTT ในเซลล์มะเร็ง 3ชนิด ได้แก่ HeLa, KB และ $B_{16}F_{10}$ เปรียบเทียบกับ vincristine พบว่า AACD ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงที่สุดได้แก่ HeLa, KB และ $B_{16}F_{10}$ที่ 1.48, 1.6 และ 1.5 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ AA เมื่อเก็บกัก DA และ AACD ในอนุภาคขนาดเล็กพบว่ามีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้สูงกว่า AA และเมื่อเก็บกัก AACD ในไลโปโซมพบว่าให้ฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งเซลล์ HeLa โดยให้ค่า IC_{50} 2.3 และ 327 ของ vincristine และ AA ตามลำดับ ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ AA, AACD และ DA ที่ถูกเก็บกักในอนุภาคขนาดเล็กด้วยวิธี SRB พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (mouse epidermal cell lines, JB6) เมื่อเปรียบเทียบกับ vincristine และยังพบว่าไลโปโซมที่ไม่ได้เก็บกักสารไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่พบฤทธิ์ดังกล่าวเพียงเล็กน้อยในนีโอโซมที่ไม่ได้เก็บกักสาร ในการศึกษาการระคายเคืองต่อผิวหนังของสัตว์ทดลองกระต่ายของ AA, AACD และ DA พบอาการแดงเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยหลังจากทดสอบด้วย 20 % AA ในโพรพีลีนไกลคอล และพบอาการแดงเห็นขอบชัดเจนหลังทดสอบด้วยสารละลาย 10% AACD แต่ไม่พบอาการบวมแดงใดภายใน 72 ชั่วโมง เมื่อทำการทดสอบด้วย DA และตำรับอนุภาคขนาดเล็กที่เก็บกักสารทั้งสามชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าจะสามารถนำ AA และอนุพันธ์ของมันที่เก็บกักในอนุภาคขนาดเล็กมาใช้ในทางยาและเครื่องสำอางได้ เนื่องจากสามารถเพิ่มการดูดซึมและประสิทธิภาพในการรักษา รวมทั้งการลดการก่อการแพ้และระคายเคืองของ AA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved