# การประเมินความคงตัว การปลดปล่อยแบบนอกกายและแนวโน้มในการก่อให้เกิดการระคายเคืองของไมนอกซิดิลนิโอโซม

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวมนชิดา กาญจนประดิษฐ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3312-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# EVALUATION OF STABILITY, IN VITRO RELEASE AND IRRITATION POTENTIAL OF MINOXIDIL NIOSOMES

Miss Monchida Kanjanapadit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmaceutics
Department of Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-3312-3

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Evaluation of Stability, In Vitro Release and Irritation Potential of Minoxidil Niosomes |
| By | Miss Monchida Kanjanapadit |
| Field of study | Pharmaceutics |
| Thesis Advisor | Nontima Vardhanabhuti, Ph.D. |
| Thesis Co-Advisor | Associate Professor Waraporn Suwakul, M.Sc. in Pharm. |

---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Waraporn Suwakul, M.Sc. in Pharm.)

.....Member

(Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong, M.Sc. in Chem.)

.....Member

(Pol. Lt. Walaisiri Muangsiri, Ph.D.)

มนชิดา กาญจนประดิษฐ์: การประเมินความคงตัว การปลดปล่อยแบบนอกกายและแนวโน้มในการก่อให้เกิดการระคายเคืองของไมนอกซิดิลนิโอโซม. (EVALUATION OF STABILITY, IN VITRO RELEASE AND IRRITATION POTENTIAL OF MINOXIDIL NIOSOMES) อ. ที่ปรึกษา: ดร. นนทิมา วรรธนะภูติ, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. วราภรณ์ สุวกูล, 117 หน้า. ISBN 974-14-3312-3.

การศึกษานี้สามารถเตรียมไมนอกซิดิลนิโอโซมจากสารลดแรงตึงผิวกลุ่มซอบิเทนเอสเทอร์ (สแปน 40, สแปน60) และโพลิออกซิเอทธิลีนแอลคิลอีเทอร์ (บริจ 52, บริจ 76) โดยมีคอเลสเทอรอลและโซลูแลน ซี 24 เป็นส่วนประกอบด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูง การศึกษาคุณลักษณะของการเกิดไมนอกซิดิลนิโอโซมทำโดยศึกษาความสามารถในการเก็บกักไมนอกซิดิลในเวซิเคิลและการเกิดโครงสร้างมอลติสครอสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงโพลาไรส์ การทดลองนี้ได้ศึกษาความคงตัวทางกายภาพ, ความคงตัวทางเคมี, การปลดปล่อยยาแบบนอกกาย, ความสามารถในการป้องกันไมนอกซิดิลจากการสลายตัวโดยมีแสงสว่างเป็นตัวเร่งและโอกาสในการก่อให้เกิดความระคายเคืองของไมนอกซิดิลนิโอโซม ผลการศึกษาแสดงว่าการเก็บกักยาขึ้นอยู่กับความยาวของสายแอลคิลของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ในสารลดแรงตึงผิวกลุ่มเดียวกันพบว่า สารที่มีสายแอลคิลที่ยาวกว่า (สแปน 60, บริจ 76) จะเก็บกักยาได้มากกว่าสารที่มีสายแอลคิลที่สั้นกว่า (สแปน 40, บริจ 52) ไมนอกซิดิลนิโอโซมมีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมีเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บโดยป้องกันแสง อัตราการปลดปล่อยไมนอกซิดิลจากเวซิเคิลขึ้นอยู่กับสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในตำรับซึ่งโดยทั่วไปจะมีอัตราการปลดปล่อยช้ากว่าสารละลายไมนอกซิดิล เมื่อทำการทดลองภายใต้ภาวะที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลต ทุกสูตรตำรับของนิโอโซมแสดงถึงความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของไมนอกซิดิลซึ่งเป็นสารที่ไวต่อแสงเมื่อเปรียบเทียบกับความคงตัวของตัวยาอิสระในน้ำ เมื่อทดสอบโดยศึกษาจากการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงพบว่า สูตรตำรับไมนอกซิดิลนิโอโซม มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการระคายเคืองน้อยกว่าไมนอกซิดิลในรูปของสารละลายในตัวทำละลายที่ใช้อยู่ในผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายทางการค้า ผลการศึกษาทั้งหมดเพียงพอที่จะสนับสนุนให้ทำการศึกษาไมนอกซิดิลนิโอโซมในสัตว์ทดลองและทางคลินิกต่อไป

ภาควิชา.....เภสัชกรรม.....
สาขาวิชา.....เภสัชกรรม.....
ปีการศึกษา....2548.....

ลายมือชื่อนิสิต..มนชิดา กาญจนประดิษฐ์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4676583833: MAJOR PHARMACY

KEY WORD: MINOXIDIL/NIOSOMES/ENTRAPMENT EFFICIENCY/RELEASE/ STABILITY

MONCHIDA KANJANAPADIT: EVALUATION OF STABILITY, IN VITRO RELEASE AND IRRITATION POTENTIAL OF MINOXIDIL NIOSOMES. THESIS ADVISOR: NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAPORN SUWAKUL, 117 pp. ISBN 974-14-3312-3.

Minoxidil (MN) niosomes were prepared from sorbitan esters (Span® 40, Span® 60) and polyoxyethylene alkyl ethers (Brij® 52, Brij® 76) in the presence of cholesterol and Solulan® C24 by sonication method. Niosome formation was characterized by the ability of the vesicles to entrap MN and the appearance of the Maltese cross under a light polarization microscope. Physical stability, chemical stability, in vitro drug release, ability to protect MN from photodegradation, and irritation potential of MN niosomes were investigated. Results showed that entrapment efficiencies of MN niosomes depended on alkyl chain length of non-ionic surfactants. Surfactants with longer alkyl chains (Span® 60, Brij® 76) resulted in larger entrapment efficiency than those with short ones (Span® 40, Brij® 52) within the same surfactant series. MN niosomes were physically and chemically stable for three months when stored at ambient temperature and protected from light. The release rate of MN from vesicles depended on the surfactant used in the preparation and was generally slower than that of MN solution. Under UV irradiation, all niosomal formulations were capable of improving stability of MN, which is a photosensitive drug, when compared with stability of free drug in aqueous solution. MN niosomal formulations were less likely to cause irritation, as detected by red blood cell hemolysis, when compared with MN in vehicle generally used in the commercial products. These results should be sufficient to justify further studies of MN niosomes in animal models and, finally, in clinical trials.

Department.....Pharmacy..... Student's signature.....

Field of study.....Pharmacy..... Advisor's signature.....

Academic year.....2005..... Co-advisor's signature.....

# ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks and gratitude to my advisor, Dr. Nontima Vardhanabhuti, for her invaluable advice, kindness, encouragement, and understanding throughout this study.

I am also profoundly thankful to Associate Professor Waraporn Suwakul, my co-advisor, for her guidance, kindness, and invaluable advice.

I also would like to express my appreciation to Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D., chairman of my thesis committee, as well as other committee members. I am grateful to Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong, and Dr. Walaisiri Muangsiri for their kind advice and comments to make this thesis complete.

A special thank goes to Assistant Professor Vichien Jongbunprasert for his advice and help with the photomicrographs. I am deeply thankful to Associate Professor Ubonhtip Nimmannit, Ph.D., for the gift of Solulan® C24.

Special thanks are given to the Graduate School, Chulalongkorn University, for granting partial financial support to my thesis work. I wish to thank the East Asiatic Co., Ltd., Thailand for supplying Span® 40, Span® 60, Brij® 52, and Brij® 76. Thanks are also due to the V&S Chemi Group Co., Ltd., Thailand for supplying prednisolone for this thesis.

Sincere thanks are also given to all staff members of the Department of Pharmacy and other people whose names have not been mentioned for their assistance and helpful support.

Ultimately, I would like to express my sincere and deepest gratitude to my family for their endless love, understanding, and encouragement throughout this thesis.

# CONTENTS


Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... ix

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF ABBREVIATIONS..... xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II LITERATURE REVIEW..... 5

Minoxidil..... 5

Pilosebaceous targeting by vesicles..... 7

Niosomes..... 10

Stability of minoxidil niosomes..... 19

Toxicity and irritation studies..... 26

III MATERIALS AND METHODS..... 29

Materials..... 29

Equipment..... 30

Methods..... 31

Solubility of minoxidil..... 31

Preparation of MN niosomes..... 31

Characterization of MN niosomes..... 32

Physical stability of MN niosomes..... 34

Drug release study..... 35

Chemical stability of MN niosomes..... 36

Photodegradation study under UV irradiation..... 38

Page

Estimation of the irritation potential of MN niosomes ..... 39
Statistical analysis..... 41
IV RESULTS AND DISCUSSION..... 42
Solubility of minoxidil..... 42
Characterization of minoxidil niosomes..... 42
Physical stability of minoxidil niosomes..... 52
Drug release studies..... 54
Chemical stability of minoxidil niosomes..... 56
Photodegradation study under UV irradiation..... 62
Estimation of the irritation potential of minoxidil niosomes..... 72
V CONCLUSIONS..... 75
REFERENCES..... 78
APPENDICES..... 87
VITA..... 117

# LIST OF TABLES


| Table | | Page |
|---|---|---|
| 1 | Physical data of Brij® 52 and Brij® 76 | 14 |
| 2 | Physical data of Span® 40 and Span® 60 | 15 |
| 3 | The advantages and disadvantages of the different methods of separation of the entrapped from the unentrapped drug | 18 |
| 4 | Solubility data of MN in water | 42 |
| 5 | Compositions of niosome formulations studied | 43 |
| 6 | The amounts of unentrapped and entrapped MN in niosomal suspensions, entrapment efficiency, % entrapment, and total recovery of MN in MN niosomes | 43 |
| 7 | The entrapment efficiencies of MN niosomes at 0, 1, 2, and 3 months of storage | 53 |
| 8 | The percentage of drug remaining of MN solution, Span® 40 niosomes, Span® 60 niosomes, Brij® 52 niosomes, and Brij® 76 niosomes during 3 months of storange | 59 |
| 9 | The amounts of drug remaining in the supernatant and in the pellet, entrapment efficiency, and total recovery of MN niosomes prepared from Span® 40:Cholesterol:Solulan® C24 (67.5:27.5:5) | 60 |
| 10 | The amounts of drug remaining in the supernatant and in the pellet, entrapment efficiency, and total recovery of MN niosomes prepared from Span® 60:Cholesterol:Solulan® C24 (57.5:37.5:5) | 60 |
| 11 | The amounts of drug remaining in the supernatant and in the pellet, entrapment efficiency, and total recovery of MN niosomes prepared from by Brij® 52:Cholesterol:Solulan® C24 (67.5:27.5:5) | 61 |
| 12 | The amounts of drug remaining in the supernatant and in the pellet, entrapment efficiency, and total recovery of MN niosomes prepared from Brij® 76:Cholesterol:Solulan® C24 (47.5:47.5:5) | 61 |

# LIST OF TABLES (continued)


Table Page

13 The percentages of drug remaining of MN solution exposed to UV light for 90days..... 64

14 The percentage of MN remaining in Span® 40, Span® 60, Brij® 52, and Brij® 76 niosomal suspensions exposed to UV light for 90 days ..... 67

15 The amounts of MN remaining in niosomal suspensions prepared from in Span® 40, Span® 60, Brij® 52, and Brij® 76 at various time intervals of UV exposure..... 68

16 The amounts of MN remaining in niosomal pellets prepared from in Span® 40, Span® 60, Brij® 52, and Brij® 76 at various time intervals of UV exposure ..... 69

17 The amounts of MN remaining in the supernatant prepared from in Span® 40, Span® 60, Brij® 52, and Brij® 76 at various time intervals of UV exposure..... 70

18 Concentrations of MN niosomes and other corresponding components that caused 50% hemolysis ..... 74

# LIST OF FIGURES


| Figure | | Page |
|---|---|---|
| 1 | Chemical structure of minoxidil | 5 |
| 2 | Schematic representation of a niosome | 11 |
| 3 | Types of niosomes depending on size and number of lamellae | 11 |
| 4 | Schematic representation of an amphiphile | 12 |
| 5 | The structure of Span 40® and Span® 60 | 14 |
| 6 | The structure of Brij® 52 and Brij® 76 | 15 |
| 7 | The structure of cholesterol | 16 |
| 8 | The structure of Solulan® C24 | 16 |
| 9 | The effect of the choice of niosome-forming surfactant on the properties of the niosomal dispersion | 21 |
| 10 | The effect of the nature of the encapsulated drug on the properties of the niosomal dispersion | 22 |
| 11 | Photographs of Span® 40:Cholesterol:Solulan® C24 niosomes at 0 month and 3 months | 45 |
| 12 | Photographs of Span® 60:Cholesterol:Solulan® C24 niosomes at 0 month and 3 months | 46 |
| 13 | Photographs of Brij® 52:Cholesterol:Solulan® C24 niosomes at 0 month and 3 months | 47 |
| 14 | Photographs of Brij® 76:Cholesterol:Solulan® C24 niosomes 0 month and 3 months | 48 |
| 15 | A representation of multimodal distributions of MN niosomes prepared form 1 day after preparation | 49 |
| 16 | Polarized-light microscopic images of the vesicles from Span® 40. Span® 60, Brij® 52, and Brij® 76 | 51 |
| 17 | Release profiles of MN niosomes and aqueous solution | 56 |
| 18 | HPLC chromatograms at the beginning and after three months of storage | 58 |

# LIST OF FIGURES (continued)

Figure Page

19 The HPLC chromatograms of photodegradation of MN in water before UV exposure compared MN after UV exposure..... 62
20 First-order degradation kinetics profile of MN in water..... 64
21 Photodegradation profiles of MN in niosomal suspensions under UV irradiation..... 66

# LIST OF ABBREVIATIONS

| | | |
|---|---|---|
| ANOVA | = | analysis of variance |
| CHO | = | cholesterol |
| cm | = | centimeter |
| $cm^2$ | = | square centimeter |
| conc. | = | concentration |
| CPP | = | critical packing parameter |
| CV | = | coefficient of variation |
| °C | = | degree Celsius |
| E | = | entrapment |
| EE | = | entrapment efficiency |
| et al. | = | et alii, and others |
| g | = | gram |
| h | = | hour |
| HLB | = | hydrophile-lipophile balance |
| HPLC | = | high performance liquid chromatography |
| HP-β-CD | = | hydroxypropyl- β-cyclodextrin |
| $H_{50}$ | = | 50% hemolysis |
| k | = | degradation rate constant |
| $k_0$ | = | zero-order rate constant |
| $k_1$ | = | first-order rate constant |
| LUVs | = | large unilamellar vesicles |
| mg | = | milligram |
| min | = | minute |
| ml | = | milliter |
| MLVs | = | multilamellar vesicles |
| MN | = | minoxidil |
| MP | = | melting point |
| MW | = | molecular weight |

| | | |
|---|---|---|
| nm | = | nanometer |
| PBS | = | phosphate buffered isotonic saline |
| POE | = | polyoxyethylene |
| $R^2$ | = | coefficient of determination |
| RBC | = | red blood cells |
| rpm | = | revolution per minute |
| SEM | = | scanning electron microscopy |
| SD | = | standard deviation |
| SDS | = | sodium dodecyl sulfate |
| SUVs | = | small unilamellar vesicles |
| UV | = | ultraviolet |
| UVs | = | unilamellar vesicles |
| v/v | = | volume by volume |
| w/v | = | weight by volume |
| µg | = | microgram |
| µl | = | microliter |
| µm | = | micrometer |