

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

อิทธิพลของชนิดของไมโครอิมัลชันที่มีผลต่อการปลดปล่อยนอกร่างกาย
การซึมผ่านและการสะสมที่ผิวหนังของสารป้องกันแสงแดดเบนโซฟีโนน 3

Influence of microemulsion types on the *in vitro* release,
skin penetration and retention of benzophenone-3

โดย

ผศ.ดร. ศรัณยู สงเคราะห์

รศ.ดร. ประภาพร บุญมี

นางสาวดวงแข มณีนวล

นางนิวรรณ แทนมณี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเภททั่วไป ประจำปี 2553

Acknowledgements

We wish to express our deep gratitude and appreciation to Prince of Songkla University for providing financial support (PHA530216S) in this project “Influence of microemulsion types on the *in vitro* release, skin penetration and retention of benzophenone-3.” Our acknowledgements are extended to Mrs. Linda Khaorapapong, administrative staff, and other staffs in the Department of Pharmaceutical Technology (Faculty of Pharmaceutical Sciences). Our special thanks are extended to Department of Pharmaceutical Technology, Pharmaceutical Laboratory Service Center and Drug Delivery System Excellence Center, Prince of Songkla University, for contributions and facility.

Sarunyoo Songkro

Head of the project

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาพฤติกรรมวัฏภาค (phase behavior) ของระบบ ซึ่งประกอบด้วยส่วนประกอบซึ่งเป็นที่ยอมรับทางเภสัชกรรม เพื่อตั้งตำรับและหาลักษณะเฉพาะของตำรับไมโครอิมัลชันของเบนโซฟีโนน 3 (benzophenone-3) รวมทั้งศึกษาเสถียรภาพของไมโครอิมัลชันนี้ และประเมินชนิดของไมโครอิมัลชันที่มีผลต่อการปลดปล่อยนอกร่างกาย การซึมผ่านและการสะสมที่ผิวหนังของตำรับไมโครอิมัลชันของเบนโซฟีโนน 3 สำหรับการศึกษาพฤติกรรมวัฏภาค ระบบการกระจายประกอบด้วย Tweens (20, 40, 60 และ 80) เป็นสารลดแรงตึงผิว, Eutanol G เป็นวัฏภาคน้ำมัน และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นวัฏภาคน้ำ มีการใช้ไดอะแกรมไตรภาคเพื่อหาพื้นที่ของไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้น มีการเกิดไมโครอิมัลชันในทุกระบบที่ศึกษา โดยระบบไมโครอิมัลชันซึ่งประกอบด้วย Tween 80 มีพื้นที่ไมโครอิมัลชันมากที่สุด รองลงมาคือระบบที่ประกอบด้วย Tween 20 ดังนั้นจึงเลือกทั้งสองระบบนี้เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยมีการผสมระบบทั้งสองด้วยสารลดแรงตึงผิวร่วมคือ ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol, IPA) ในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก คือ 1:1 และ 2:1 มีการเตรียมตำรับทั้งหมดหกตำรับ ในอัตราส่วน 18:72:10 (น้ำมัน, สารลดแรงตึงผิว หรือ ของผสมของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม) หลังจากนั้นจึงผสมไมโครอิมัลชันแต่ละตำรับกับเบนโซฟีโนน 3 ที่ปริมาณ 5% โดยน้ำหนัก ตำรับที่เตรียมขึ้นถูกประเมินในแง่ของชนิดและสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (ความหนืด, ความเป็นกรด-ด่าง (pH), ประจุบนผิว (zeta potential), ขนาดอนุภาค และสัญญาณวิทยา) เมื่อทดสอบด้วยการทดสอบการเจือจาง (dilution test) และการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) พบว่า ไมโครอิมัลชันสองตำรับที่ไม่มี IPA เป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ส่วนไมโครอิมัลชันทั้งสี่ตำรับที่มี IPA เป็นส่วนประกอบ เป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) ซึ่งชนิดของไมโครอิมัลชันไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเติมสารกันแดด ตำรับไมโครอิมัลชันที่ศึกษามีลักษณะการไหลเป็นแบบนิวตัน (Newtonian) โดยความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันสองตำรับที่ไม่มี IPA มีค่าสูงกว่าตำรับที่มี IPA เป็นส่วนประกอบ ค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับที่ไม่มีสารกันแดดและตำรับที่มีสารกันแดด อยู่ในช่วง 7.43-8.20 ขนาดของอนุภาคเฉลี่ยต่ำกว่า 300 นาโนเมตร ขนาดของหยดมีความสม่ำเสมอโดยพิจารณาจากค่าดัชนีการกระจายตัว (polydispersity index) ที่ต่ำ ค่าประจุบนผิวเป็นลบ สัญญาณวิทยาของไมโครอิมัลชันที่มีเบนโซฟีโนน 3 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน (TEM) แสดงให้เห็นถึงรูปร่างทรงกลม

สำหรับการศึกษาเสถียรภาพทางฟิสิกส์และทางเคมีของไมโครอิมัลชันโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (6 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา สองเดือน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง, ขนาดอนุภาค และค่าประจุบนผิวของตำรับที่เก็บไว้ อย่างไรก็ตาม ตำรับยังคงมีลักษณะใส และไม่สังเกตเห็นการแยกเฟส มีการเปลี่ยนแปลงของสีในตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์โดยโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แสดงให้เห็นว่าปริมาณของเบนโซฟีโนน 3 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาการปลดปล่อยนอกร่างกายผ่านเมมเบรนสังเคราะห์ด้วย Franz diffusion cell พบว่าการปลดปล่อยของเบนโซฟีโนน 3 เป็นไปตามจลนพลศาสตร์อันดับศูนย์ อัตราการปลดปล่อยสูงสุดพบในตำรับ o/w ไมโครอิมัลชันซึ่งมี 1:1 Tweens:IPA ส่วนอัตราการปลดปล่อยของ ตำรับ w/o ไมโครอิมัลชัน และ ตำรับ o/w ไมโครอิมัลชัน ซึ่งมี 2:1 Tweens:IPA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการซึมผ่านผิวหนังนอกร่างกายผ่านหนังลูกหมูแรกเกิด พบว่า ตำรับ o/w ไมโครอิมัลชันมีการซึมผ่านของสารกันแดดมากกว่าตำรับ w/o ไมโครอิมัลชัน นอกจากนี้พบว่าตำรับ o/w ไมโครอิมัลชันซึ่งมี 1:1 Tweens:IPA มีอัตราการซึมผ่านผิวหนังสูงกว่า ตำรับ o/w ไมโครอิมัลชัน ซึ่งมี 2:1 Tweens:IPA ธรรมชาติของไมโครอิมัลชัน (ชนิด และส่วนประกอบ) เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการปลดปล่อยและการซึมผ่านผิวหนังของสารกันแดด การศึกษาการสะสมผิวหนังนอกร่างกายแสดงว่าเบนโซฟีโนน 3 สามารถสะสม (accumulation) อยู่ในผิวหนัง โดยตำรับที่มี 2:1 Tweens:IPA มีการสะสมของสารกันแดดสูงกว่าตำรับอื่นๆ อันดับของอัตราส่วนระหว่างการสะสมที่ผิวหนังและการซึมผ่านผิวหนังเมื่อเรียงจากมากไปน้อยคือ ตำรับ o/w ไมโครอิมัลชัน ซึ่งมี 2:1 Tweens:IPA มากกว่า w/o ไมโครอิมัลชัน มากกว่า o/w ไมโครอิมัลชันซึ่งมี 1:1 Tweens:IPA ในการศึกษาที่ o/w ไมโครอิมัลชัน ซึ่งมี 2:1 Tweens:IPA อาจเป็นกระสายยาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำส่งเฉพาะที่ของเบนโซฟีโนน 3

คำสำคัญ: เบนโซฟีโนน 3, ไมโครอิมัลชัน, การศึกษาการปลดปล่อย, การซึมผ่านผิวหนัง, การสะสมที่ผิวหนัง

Abstract

The aims of this work were to investigate the phase behavior of systems composed of acceptable pharmaceutical components; to formulate and characterize benzophenone-3 loaded microemulsions; to investigate the stability of benzophenone-3 loaded microemulsions; and to evaluate the effect of microemulsion type on the *in vitro* release, skin penetration and retention of benzophenone-3 from microemulsions. For the phase behavior examination, the dispersion systems were composed of Tweens (20, 40, 60 and 80) as surfactants, Eutanol G as oil phase and sterile water as aqueous phase. With the aid of ternary phase diagram, the microemulsion regions were determined. It was found that microemulsion regions were achieved with every studied system. The microemulsion system consisted of Tween 80 provided the largest microemulsion regions followed by the system composed of Tween 20. Therefore, these two systems were selected for further investigation. Both systems were incorporated with a co-surfactant, isopropyl alcohol (IPA), at weight ratios of 1:1 and 2:1. Overall, six microemulsion formulations at ratio of 18:72:10 (oil: surfactant or mixtures of surfactant and co-surfactant: water) were selected from these systems. Each blank microemulsion formulation was then incorporated with 5% w/w benzophenone-3, a sunscreen agent. These prepared microemulsions were evaluated for type and physicochemical property (viscosity, pH, zeta potential, particle size and morphology). Using dilution test and electrical conductivity, the type of these microemulsions were assessed. The two blank microemulsion formulations which did not contain IPA were indicated as w/o whereas; the four blank microemulsions containing IPA were classified as o/w microemulsions. The types of microemulsion systems did not change after the incorporation of the sunscreen. All studied microemulsions displayed Newtonian flow characteristics. The microemulsions without IPA had much higher viscosity than the microemulsions with IPA did. The pH values of both blank and benzophenone-3 loaded microemulsions were in the ranges of 7.43 to 8.20. The average particle sizes of both blank and benzophenone-3 loaded microemulsions were found to be less than 300 nm. The microemulsion droplets were uniform as indicated by a low polydispersity index. The negative values of zeta potential were obtained. The morphology of all benzophenone-3 loaded microemulsions was investigated by transmission electron microscope (TEM). The TEM results showed the spherical shapes. For the stability study, both physical and chemical stabilities of the studied microemulsions were evaluated at various temperatures (6 °C, room temp (about 30 °C) and 45 °C for up to two months. There were some changes

in pH, viscosity, particle size, and zeta potential values of the stored microemulsions. Nevertheless, all microemulsions remained transparent and no phase separation was observed. The color changes were found in the samples kept at 45 °C. The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis revealed that the content of benzophenone-3 of all stored microemulsions did not differ significantly from that of the freshly prepared formulations. From the *in vitro* release study through synthetic membrane using modified Franz diffusion cell, the results showed that the plots of cumulative released of benzophenone-3 were fitted best to zero order kinetic ($r^2 > 0.99$). The greatest release rate was achieved with the o/w microemulsions which contained 1:1 Tweens:IPA. The release rates of the w/o formulations and the o/w microemulsions which contained 2:1 Tweens:IPA were not significantly different. For the *in vitro* skin permeation through excised newborn pig skin, the o/w microemulsions gave higher skin permeation of benzophenone-3 than the w/o microemulsions. In addition, the o/w microemulsions with 1:1 Tweens:IPA provided higher transdermal flux than those with 2:1 Tweens:IPA. The natures of microemulsions (types and compositions) played a crucial role in controlling the release and the percutaneous absorption of the sunscreen. The *in vitro* skin retention study demonstrated that benzophenone-3 could be accumulated in the skin. The skin accumulation of the o/w microemulsions containing 2:1 Tweens:IPA appeared to be higher than the other formulations. The rank order of the ratio between skin retention and skin permeation was found to be o/w microemulsions (2:1 Tweens:IPA) > w/o microemulsions > o/w microemulsions (1:1 Tweens:IPA). In the present study, the o/w microemulsions with 2:1 Tweens:IPA may be promising carrier systems for topical delivery of benzophenone-3.

Key words: benzophenone-3, microemulsions, release study, skin penetration, skin retention

LIST OF CONTENTS

	Page
TITLE PAGE	i
ACKNOWLEDGEMENTS	ii
ABSTRACT (THAI)	iii
ABSTRACT(ENGLISH)	v
LIST OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
CHAPTER	
1 INTRODUCTION AND OBJECTIVES	1
1. Introduction	1
2. Objectives	11
2 MATERIALS AND METHODS	12
1. Materials	12
2. Construction of pseudoternary Phase Diagram by Preparing a Large Number of Individual Tubes	12
3. Preparation of microemulsions and of Benzophenone-3 Loaded Microemulsions	13
4. Characterization of the prepared microemulsions	15
5. Stability of benzophenone-3 loaded microemulsions	17
6. <i>In vitro</i> release study of benzophenone-3 loaded microemulsions	17
7. <i>In vitro</i> skin penetration study of benzophenone-3 loaded microemulsions	20
8. <i>In vitro</i> skin retention study of benzophenone-3 loaded microemulsions	21
9. High performance liquid chromatographic determination of benzophenone-3	22
10. Statistical analysis	30

LIST OF CONTENTS (continued)

	Page
3 RESULTS AND DISCUSSION	31
1. Construction of pseudoternary phase diagram by preparing a large number of individual tubes	31
2. Benzophenone-3 loaded microemulsions	35
3. Characteristics of prepared microemulsions	35
4. Stability of benzophenone-3 loaded microemulsions	45
5. <i>In vitro</i> release study of benzophenone-3 loaded microemulsions	66
6. <i>In vitro</i> skin penetration study of benzophenone-3 loaded microemulsions	76
7. <i>In vitro</i> skin retention study of benzophenone-3 loaded microemulsions	82
8. HPLC Validation of Benzophenone-3	88
4 CONCLUSIONS	101
REFERENCES	105
VITAE	113

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	FDA sunscreen final monograph ingredients	2
2.	Physicochemical properties of benzophenone-3	3
3.	The properties of oil used in the study	8
4.	The properties of surfactants used in the study	9-10
5.	The properties of co-surfactant used in the study	11
6.	Compositions of microemulsion formulations	14
7.	Kinetics of drug release	20
8.	Dilution test and conductivity measurement of blank and benzophenone-3 loaded microemulsions	38
9.	Viscosity and pH of the freshly prepared microemulsion	42
10.	Particle size, polydispersity index and zeta potential of freshly prepared blank and benzophenone-3 loaded microemulsions	44
11.	pH of stored microemulsion in three different conditions in comparison with freshly prepared microemulsions	47
12.	Viscosity of stored microemulsions in three different conditions in comparison with freshly prepared microemulsions	61
13.	Particle sizes of stored microemulsions in three different conditions in comparison with the freshly prepared microemulsions	63
14.	Polydispersity index of stored microemulsions in three different conditions in comparison with the freshly prepared microemulsions	64
15.	Zeta potential of stored microemulsions in three different conditions in comparison with the freshly prepared microemulsions	64
16.	Release parameters of benzophenone-3 from different formulations	72
17.	Skin permeation fluxes of benzophenone-3	79
18.	Linearity, intra-day, inter-day, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of benzophenone-2 from HPLC assay	100

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Representation of the three encountered microemulsion types: (a) oil-in-water, (b) bicontinuous, and (c) water-in-oil microemulsion	6
2.	Pseudoternary phase diagrams of the system of water, Eutanol G and Tweens; white area: unstable dispersion, shaded area: microemulsion region	33
3.	Pseudoternary phase diagrams of the systems of water and Eutanol G at different ratios of Tween20/80 and isopropyl alcohol (1:1 and 2:1); white area: unstable dispersion, shaded area: microemulsion region	34
4.	Appearances of blank and benzophenone-3 loaded microemulsions: 1=ME-1; 2=ME-1-B3; 3=ME-2; 4=ME-2-B3; 5=ME-3; 6=ME-3-B3; 7=ME-4; 8=ME-4-B3; 9=ME-5; 10=ME-5-B3; 11=ME-6; 12= ME-6-B3	35
5.	Polarized-light microscopy pictures showing dark view of (A) ME-1, (B) ME-1-B3, (C) ME-2, (D) ME-2-B3	36
6.	Flow property of freshly prepared microemulsions determined at 32 °C. Each point represents mean \pm SD, $n = 3$, where n is the number of samples.	40
7.	Flow property of a stored microemulsion, ME-1, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (\approx 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-1	49
8.	Flow property of a stored microemulsion, ME-1-B3, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (\approx 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-1-B3	50
9.	Flow property of a stored microemulsion, ME-2, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (\approx 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-2	51
10.	Flow property of a stored microemulsion, ME-2-B3, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (\approx 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-2-B3	52
11.	Flow property of a stored microemulsion, ME-3, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (\approx 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-3	53

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
12.	Flow property of a stored microemulsion, ME-3-B3, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (≈ 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-3-B3	54
13.	Flow property of a stored microemulsion, ME-4 kept in three conditions, 6 °C, room temperature (≈ 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-4	55
14.	Flow property of a stored microemulsion, ME-4-B3, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (≈ 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-4-B3	56
15.	Flow property of a stored microemulsion, ME-5, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (≈ 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-5	57
16.	Flow property of a stored microemulsion, ME-5-B3, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (≈ 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-5-B3	58
17.	Flow property of a stored microemulsion, ME-6, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (≈ 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-26	59
18.	Flow property of a stored microemulsion, ME-6-B3, kept in three conditions, 6 °C, room temperature (≈ 30 °C) and 45 °C in comparison with a freshly prepared microemulsion, ME-6-B3	60
19.	Chemical stability of benzophenone-3 loaded microemulsions stored in three different conditions after 2 months of storage	66
20.	<i>In vitro</i> release profiles of benzophenone-3 from various micremulsion formulations	67
21.	Curve fitting of the <i>in vitro</i> release data of benzophenone-3 microemulsions: ME-1-B3 and ME-2-B3; (A) zero order model (B) first order model (C) Higuchi model	69
22.	Curve fitting of the <i>in vitro</i> release data of benzophenone-3 microemulsions: ME-3-B3 and ME-4-B3; (A) zero order model (B) first order model (C) Higuchi model	70

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
23.	Curve fitting of the <i>in vitro</i> release data of benzophenone-3 microemulsions: ME-5-B3 and ME-6-B3; (A) zero order model (B) first order model (C) Higuchi model	71
24.	Relationship between apparent viscosity and release rate	75
25.	<i>In vitro</i> permeation profiles of benzophenone-3 through newborn pig skin from various microemulsion formulations	79
26.	Relationship between release rate and transdermal flux of benzophenone-3: (A) scatter data; (B) linear regression analysis.	80
27.	Relationship between conductivity and transdermal flux of benzophenone-3: (A) scatter data; (B) linear regression analysis.	81
28.	Comparison between the amount of benzophenone-3 accumulated in the skin and permeated through the skin into the receptor fluid at 24 h	85
29.	Ratio between the skin retention and permeation of benzophenone-3	85
30.	Relationship between skin accumulation of benzophenone-3 (SC_{24}) and cumulative amount of benzophenone-3 in the receptor fluid at 24 h (Q_{24}): (A) scatter data; (B) linear regression analysis.	86
31.	Relationship between skin accumulation of benzophenone-3 at 24 h (SC_{24}) and transdermal flux: (A) scatter data; (B) linear regression analysis.	87
32.	HPLC chromatograms of benzophenone-3 in (A) standard solution (B) released through synthetic membrane into the receptor fluid (C) permeated through pig skin into the receptor fluid	91
33.	Standard curve of benzophenone-3 in receptor fluid for release study	92
34.	Standard curve of benzophenone-3 in receptor fluid for skin penetration study at low concentration	92
35.	Standard curve of benzophenone-3 in receptor fluid for skin penetration study at high concentration	93
36.	HPLC chromatograms of benzophenone-3 in (A) standard solution (B) excised newborn pig skin (supernatant of newborn pig skin homogenate)	95

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
37.	Standard curve of benzophenone-3 in supernatant of newborn pig skin homogenate for skin retention study	96
38.	HPLC chromatograms of benzophenone-3 (A) in standard solution (B) remained in donor compartment plus the ethanol wash	98
39.	Standard curve of benzophenone-3 in absolute ethanol	99