

Thesis Title	Development of Elastic Nanovesicular Formulations Loaded with Extracts Containing Bioactive Compounds from Thai Medicinal Plants for Topical Anti-aging	
Author	Ms. Pensak Jantrawut	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Aranya Manosroi	Advisor
	Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Co-advisor
	Prof. Dr. Toshihiro Akihisa	Co-advisor
	Prof. Dr. Kenji Sugibayashi	Co-advisor

ABSTRACT

The objective of this study was to develop the elastic nanovesicular formulations loaded with Thai medicinal plant extracts containing bioactive compounds for topical anti-aging. The *in vitro* anti-aging activities including antioxidative, tyrosinase inhibition and proliferative stimulation as well as the MMP-2 expression inhibition on human skin fibroblasts of *Terminalia chebula* gall were compared with the 14 Thai Lanna medicinal plants with the indication for longevity selected from the database of Thai Lanna medicinal plant recipes “Manosroi II”. The selected 14 plants including *T. chebula* gall were extracted by distilled water and methanol by hot (Soxhlet 60-65 ± 2 °C) and cold (maceration and sonication 27 ± 2°C) process. The cold water extract of *T. chebula* gall which demonstrated potent DPPH radical scavenging activity at the % scavenging of 84.64 ± 2.22%, proliferation stimulation activity on normal human fibroblasts at the stimulation index of 1.44 (1.19 times more potent than ascorbic acid) and inhibition of MMP-2 expression at 1.37 times more potent than ascorbic acid was selected for further isolation and purification. Six phenolic compounds including gallic acid (1.84%), punicalagin (1.86%), isoterchebulin (2.20%), 1,3,6-tri-*O*-galloyl-β-D-glucopyranose (0.77%), chebulagic acid (1.80%) and chebulinic acid (4.93%) were found and identified by NMR. The novel elastic niosomal formulation composed of cholesterol and Tween 61 at 1:1 molar ratio with 25% ethanolic solution prepared by chloroform film method with sonication was developed using diclofenac as a model drug and selected to load with the semi-purified extract of the *T. chebula* galls. The selected semi-purified fraction (F1, methanol/water/acetic acid = 2:8:0.1) containing the three phenolic compounds including gallic acid (15.3%), 1,3,6-tri-*O*-galloyl-β-D-glucopyranose (17.8%) and punicalagin (38.4%) was loaded in the developed elastic and non-elastic niosomes in 5 mM phosphate buffer (pH 7). The morphology of elastic and non-

elastic niosomes was the mixture of unilamellar and multilamellar vesicles with negative zeta potential values and had the particle size range at 200-400 nm. The elastic niosomes showed higher deformability index than the non-elastic niosomes of about 4 times. Both elastic and non-elastic niosomes loaded with gallic acid or the semi-purified fraction containing gallic acid showed physical stability with no layer separation and gave chemical stability with more than 70, 60 and 40% of the remaining gallic acid containing in the semi-purified fraction, while only more than 60, 40 and 30% of the remaining gallic acid in the pure gallic acid solution when kept for 3 months at 4 ± 2 , 27 ± 2 and $45 \pm 2^\circ\text{C}$, respectively. The gel formulations incorporated with the elastic and non-elastic niosomes loaded with gallic acid or the semi-purified fraction from *T. chebula* galls gave good physical stability with no sedimentation, no layer separation and no color change at all temperatures with more than 80, 70 and 60% of the remaining gallic acid when kept for 3 months at 4, 27 and 45°C , respectively. For rat skin transdermal absorption by Franz diffusion cells, elastic niosomes retarded the permeation of the loaded pure gallic acid indicating of no risk of systemic effect. However, elastic niosomes enhanced the permeation of the loaded gallic acid containing in the semi-purified fraction. For the *in vivo* tests, three male rabbits were used for skin irritation test by the closed patch test and 31 (13 men and 18 women) Thai volunteers in the age range of 24-47 years old were enrolled in the human skin anti-aging evaluation study. The gels were applied on the volar forearm twice daily for 8 weeks. Gel containing the unloaded fraction (SS) or loaded in non-elastic (SN) or elastic (SE) niosomes and gallic acid loaded in non-elastic (GN) or elastic (GE) niosomes showed no skin irritation while the unloaded gallic acid (GS) gave irritation in rabbit's skin. The gel containing gallic acid or semi-purified fraction loaded in elastic or non-elastic niosomes significantly demonstrated higher improvement of skin elasticity and roughness more than the gel containing the unloaded semi-purified fraction. The % parameter changes of skin elastic recovery (U_r/U_f) and skin elastic extension (U_v/U_e) when applied with SN and SE gels were +28.73 and +32.57; -21.25 and -22.63% respectively. SN and SE gel also showed a significant decrease of the maximum roughness (R_m) and average roughness (R_a) values with the parameter changes of -29.43 and -32.38; -39.47 and -35.28%, respectively. However, there was no significant difference of these effects between the gel containing gallic acid or semi-purified fraction loaded in elastic and non-elastic niosomes. The developed gel containing the semi-purified fraction of *T. chebula* gall extract loaded in elastic niosomes can be applied as a novel topical product due to their superior *in vitro* and *in vivo* anti-aging activities.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การพัฒนาตำรับถั่งชืดหุ่ยขนาดนาโนที่เก็บกักสารสกัดที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรรไทยเพื่อใช้ทาชะลอความแก่

ผู้เขียน

นางสาว เพ็ญศักดิ์ จันทราวุธ

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ. ดร. จิรเดช มโนสร้อย

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศ. ดร. โทชิฮิโร อะกิชิฮา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศ. ดร. เคนจิ ชูกิบายาชิ

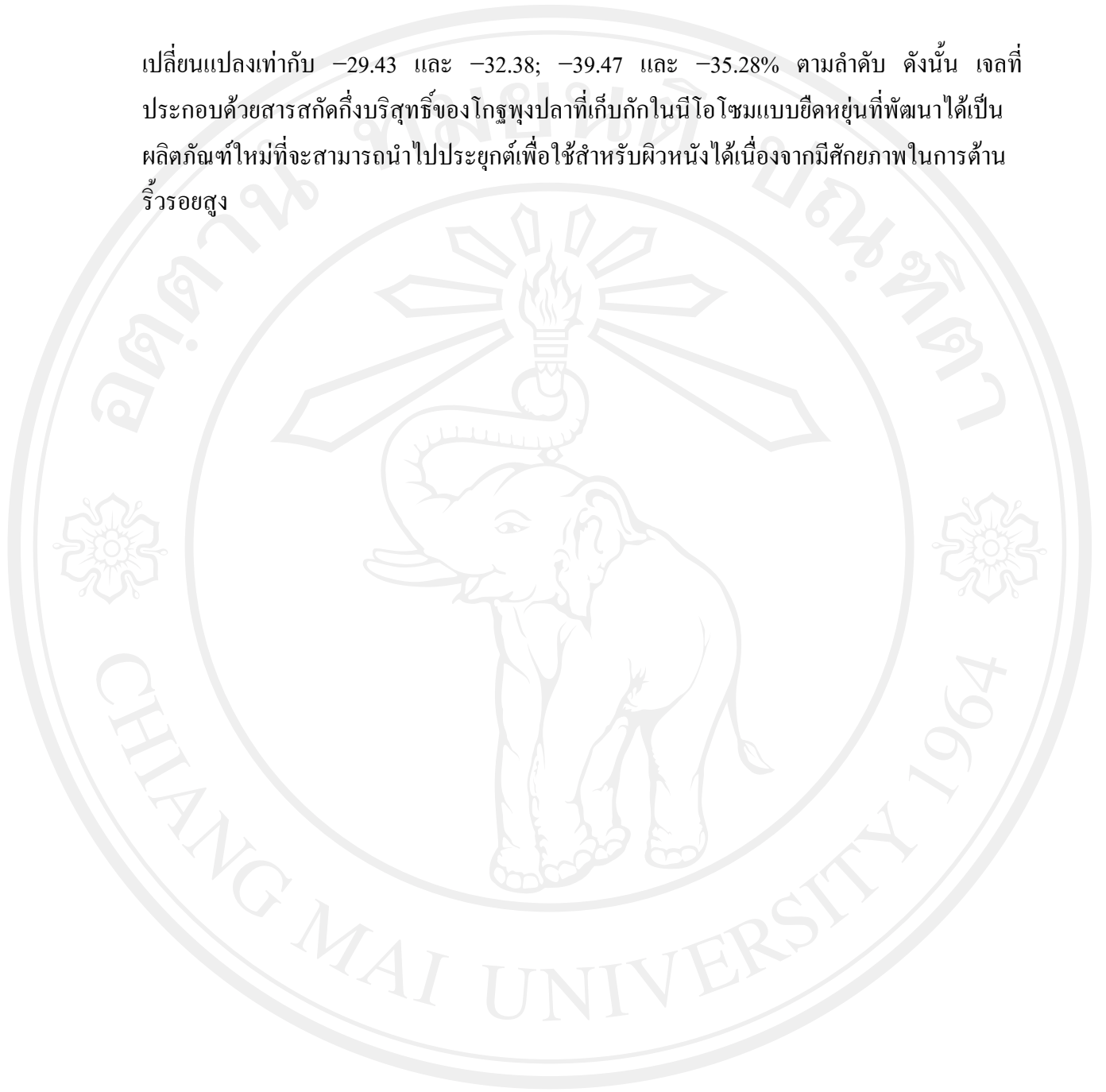
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับถั่งชืดหุ่ยขนาดนาโนที่เก็บกักสารสกัดที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรรไทยเพื่อใช้ทาชะลอความแก่ ได้คัดเลือกสมุนไพรร 14 ชนิดและโกลูฟงปลาชนิดจากฐานข้อมูลสมุนไพรรโปรแกรม “มโนสร้อย II” แล้วสกัดด้วยน้ำหรือเมธานอลร้อน $60-65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ใช้วิธี Soxhlet) และเย็น $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ใช้วิธี maceration ร่วมกับการ sonication) แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ชะลอความแก่ในหลอดทดลองซึ่งได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ normal human skin fibroblast และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-2 พบว่าสารสกัดโกลูฟงปลาด้วยน้ำเย็นให้ฤทธิ์สูงสุดในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ scavenging เท่ากับ $84.64 \pm 2.22\%$ มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ normal human skin fibroblast สูงเท่ากับ 1.44 ซึ่งมากกว่าวิตามินซีที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน 1.19 เท่า และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-2 สูงกว่าวิตามินซี 1.37 เท่า ได้นำสารสกัดด้วยน้ำเย็นของโกลูฟงปลา มาแยกและวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR พบสารสำคัญคือ gallic acid (1.84%), punicalagin (1.86%), isoterchebulin (2.20%), 1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucopyranose (0.77%), chebulagic acid (1.80%) and chebulinic acid (4.93%) จากนั้นได้แยกสารสกัดทิ้งบริสุทธิ

โดยใช้ methanol/water/acetic acid เท่ากับ 2:8:0.1 พบว่ามี gallic acid (15.3%), 1,3,6-trigalloylglucopyranoside (17.8%) and punicalagin (38.4%) ได้พัฒนานีโอโซมแบบยึดหยุ่นที่ประกอบด้วยทวิน 61 ผสมกับคอเลสเตอรอลในอัตราส่วนโมลาร์ 1:1 ใน 25% เอทานอล ซึ่งเตรียมโดยวิธี chloroform film with sonication โดยใช้ไดโคลฟีแนคเป็นตัวยึดแบบ เมื่อนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ไปเก็บกักในนีโอโซมแบบยึดหยุ่นและไม่ยึดหยุ่น ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 พบว่านีโอโซมมีลักษณะรูปร่างโครงสร้างเป็นแบบยูนิลามลาร์และมัลติลามลาร์ มีศักย์ซีต้าเป็นลบ และมีขนาดอนุภาค 200-400 นาโนเมตร โดยนีโอโซมแบบยึดหยุ่นมีค่า deformability index สูงกว่านีโอโซมแบบไม่ยึดหยุ่นประมาณ 4 เท่า นีโอโซมแบบยึดหยุ่นและไม่ยึดหยุ่นที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์มีความคงตัวทางกายภาพ ไม่แยกชั้น และมีความคงตัวทางเคมี โดยมีเปอร์เซ็นต์ gallic acid เหลือที่มากกว่า 70, 60 และ 40% ในขณะที่ gallic acid ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซมพบเหลือเพียงมากกว่า 60, 40 และ 30% เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือนที่ 4 ± 2 , 27 ± 2 และ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เจลที่ประกอบด้วยสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากโกฐพุงปลาที่เก็บกักในนีโอโซมแบบยึดหยุ่นและไม่ยึดหยุ่น มีความคงตัวทางกายภาพ ไม่ตกตะกอน ไม่แยกชั้น และมีความคงตัวทางเคมี โดยมีเปอร์เซ็นต์ gallic acid ที่เหลือมากกว่า 80, 70 และ 60% เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือนที่ 4 ± 2 , 27 ± 2 และ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในการศึกษาการซึมผ่านหนังหนู โดย vertical Franz diffusion cells พบว่านีโอโซมแบบยึดหยุ่นลดการซึมผ่านหนังหนูของ gallic acid บริสุทธิ์ซึ่งแสดงว่านีโอโซมจะช่วยลดผลข้างเคียงจากการดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต แต่ช่วยเพิ่มการซึมผ่านของ gallic acid ที่อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ได้ ในการศึกษาการแพ้และระคายเคืองต่อผิวหนังด้วยวิธี closed patch test พบว่าเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ไม่ได้เก็บกัก (SS) และที่เก็บกักในนีโอโซมแบบไม่ยึดหยุ่น (SN) และยึดหยุ่น (SE) รวมทั้งเจลที่มีส่วนผสมของ gallic acid ที่เก็บกักในนีโอโซมแบบไม่ยึดหยุ่น (GN) และยึดหยุ่น (GE) ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ใดๆก็ตามตามเจลที่มี gallic acid ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซม (GS) พบว่าก่อนการระคายเคือง ในการทดสอบฤทธิ์ชะลอความแก่ในอาสาสมัคร 31 คน (ชาย 13 คน และหญิง 18 คน ที่มีอายุอยู่ในช่วง 24-47 ปี) โดยให้ทาเจลวันละ 2 ครั้ง ทุกวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเจลที่มีส่วนผสมของ gallic acid หรือสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่เก็บกักในนีโอโซมทั้งแบบยึดหยุ่นและไม่ยึดหยุ่น มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความยืดหยุ่นและลดริ้วรอยของผิวอาสาสมัครได้มากกว่าเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซม โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของ skin elastic recovery (Ur/Uf) และ skin elastic extension (Uv/Ue) เมื่อใช้เจล SN และ SE เท่ากับ +28.73 และ +32.57; -21.25 และ -22.63% ตามลำดับ นอกจากนี้เจล SN และ SE ยังสามารถลดค่า maximum roughness (Rm) และ average roughness (Ra) ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีเปอร์เซ็นต์การ

เปลี่ยนแปลงเท่ากับ -29.43 และ -32.38 ; -39.47 และ -35.28% ตามลำดับ ดังนั้น เจลที่ประกอบด้วยสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์ของโกฐพุงปลาที่เก็บกักในนีโอโซมแบบยึดหยุ่นที่พัฒนาได้เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่จะสามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้สำหรับผิวหนังได้เนื่องจากมีศักยภาพในการต้านริ้วรอยสูง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved