

การกักเก็บของสารประกอบพอลิฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดใบเตยในระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ณัฐชา พฤษสุภ¹, พิชญ์จิรา สงวนบุญญพงษ์¹, ชนัญญา รักษ์เรืองนาม¹,
บัญชา ยิ่งงาม¹, ณัฐพันธุ์ ศุภกา², วันดี รังสิจิตรประภา¹

บทคัดย่อ

การกักเก็บของสารประกอบพอลิฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบเตยในระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนเมตรเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ณัฐชา พฤษสุภ¹, พิชญ์จิรา สงวนบุญญพงษ์¹, ชนัญญา รักษ์เรืองนาม¹,บัญชา ยิ่งงาม¹, ณัฐพันธุ์ ศุภกา¹, วันดี รังสิจิตรประภา¹

บทนำ: สารสกัดใบเตย มีสารประกอบพอลิฟีนอลิกสูง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีแต่มีความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังต่ำซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้เป็นเครื่องสำอาง การศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อกักเก็บสารสกัดใบเตยในระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร วิธีการดำเนินการวิจัย: สกัดใบเตยด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอล 78% และน้ำ วิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมายกรดแคพโพลีควินิกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการจับอนุมูลอิสระ DPPH และเตรียมสารสกัดใบเตยในระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนโดยวิธีหลอมด้วยความร้อนโดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิวชนิดออกแบบส่วนประสมกลาง 2⁴ แฟคทอเรียล ซึ่งประกอบด้วยคอมพริทอล 888 เอทีโอ และกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต (1:1), เลกซอล จีที 865, ทวิน 80 และลูทอรอล เอฟ 68 (1:1) และสารสกัดใบเตย ผลการศึกษาวิจัย: สารสกัดใบเตยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ร้อยละ 50 เท่ากับ 26.49±1.27 µg/mL มีปริมาณกรดแคพโพลีควินิก 41.66±0.07 mg/g สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมสารสกัดใบเตยในระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโน คือ คอมพริทอล 888 เอทีโอ และกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต, เลกซอล จีที 865, ทวิน 80 และลูทอรอล เอฟ 68 และสารสกัดใบเตย มีร้อยละต่อน้ำหนักเท่ากับ 5.77, 45, 2, 3.3 ตามลำดับ โดยมีค่าขนาดอนุภาคเท่ากับ 125.67±3.21 nm, ค่าการกระจายอนุภาคเท่ากับ 0.158±0.011 ศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเท่ากับ -11.20±0.40 mV และร้อยละการกักเก็บสารพอลิฟีนอลิกเท่ากับ 57.58±3.14 ค่าที่ได้ทดลองสอดคล้องกับค่าที่ทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ การกักเก็บสารสกัดใบเตยลงในตำรับช่วย จากการควบคุมการปลดปล่อยสารและเพิ่มการซึมผ่านของสารเครื่องหมายลงในผิวหนังได้ **สรุปผลการวิจัย:** การกักเก็บสารสกัดใบเตยในระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำส่งสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดใบเตย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การซึมผ่านผิว ระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง

¹ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

*Corresponding author: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190 โทรศัพท์ 045- 353616 โทรสาร 045-353626 e-mail: wandeeim@yahoo.com

Abstract

Encapsulation of Polyphenolic Antioxidants from *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* Leaf Extract in Nanostructured Lipid Carriers for Cosmetics applications

Natcha Prueksupee¹, Chananya Rakreangnam¹, Pitjira Sanguanboonyaphong¹, Bancha Yingngam¹, Nuttapan Supaka², Wandee Rungseevijitprapa^{1*}

Introduction: *Cratoxylumformosum* ssp. *formosum* (CFF) leaf extract contains high amount of polyphenolic content and has strongly antioxidant activity but its high aqueous solubility may lead to low skin permeation. Encapsulation of the CFF extract in nanostructure liquid carriers (CFF-NLC) is an interesting method to enhance the delivery of the active into deeper layer of skin. Objective is encapsulation the CFF extract in nanostructured liquid carriers (NLC) and 2^4 -factorial central composite design was used to obtain the optimized formulations. **Materials and Method:** Phenolic compounds from CFF leaves were extracted in the mixture of ethanol 78% and water. The amount of phenolic compound in the CFF was determined by using 5-O-caffeoylquinic acid as a standard biomarker. Antioxidant activity was assessed by DPPH free radical scavenging assay. The CFF-NLC was then prepared using hot melted homogenization using a 2^4 -factorial central composite design. The CFF-NLC was composed of Compritol[®] 888 ATO+GMS[®] 1:1), Lexol[®] GT 865, Tween[®] 80+Lutrol[®] F68 (1:1) and CFF. **Results:** The CFF extract showed IC₅₀ value of 26.49±1.27 µg/mL with amount of 5-O-caffeoylquinic acid at 41.66±0.07 mg/g. The optimum conditions for CFF-NLC preparations were X_1 = %5.77w/w, X_2 = %45w/w, X_3 = %3.3w/w, and X_4 = %2w/w. The mean particle size of the optimum CFF-NLC, polydispersity index, zeta potential, and entrapment efficiency were 3.21±125.67 nm, 0.011±0.158, -0.40±11.20 mV and %3.14±57.58, respectively. The experimental values were well correspondent to the predicted values obtained from the proposed mathematical model. Encapsulation of CFF extract into NLC gave a controlled released property and improved skin permeation. **Conclusion:** CFF-NLC was a promising candidate for delivery the antioxidants for further cosmetic applications.

Keywords: *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum*, Antioxidant, Skin permeation, Nanostructured Lipid Carriers, Response surface methodology

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warinchamrab, Ubon Ratchathani

* **Corresponding author:** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warinchamrab, Ubon Ratchathani, Thailand 34190 Tel. 045- 353616 Fax. 045-353626 e-mail: wandeeim@yahoo.com

บทนำ

ตัว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* (CFF) เป็นพืชสกุล *Cratoxylum* จัดอยู่ในวงศ์ Guttiferae ซึ่งพบได้มากในภาคอีสาน จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ตัวมีสารกลุ่มฟอลิฟีนอลในปริมาณสูง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี เมื่อเทียบกับวิตามินซี มีรสเปรี้ยวร่วมกับมีรสฝาดสมาน (Sripanidkulchai *et al.*, 2010)

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในใบตัวคือ chlorogenic acid ซึ่งพบในปริมาณสูงถึงร้อยละ 60ทั้งหมด สารเคมีรองลงมาคือ อนุพันธ์ของ dicaffeoylquinic acid และ ferulic acid (Maisuthisakul *et al.*, 2007) จากโครงสร้างทางเคมีจะพบว่า chlorogenic acid เป็นสารกลุ่มเอสเทอร์ที่เกิดจาก cinnamic acids และ quinic acid เรียกตามชื่อ IUPAC ว่า -5-O-caffeoylquinic acid หรือ -3CQA (Clifford, 2000) สารสำคัญในตัวมีความคงตัวต่ำ เนื่องจากเป็นสารจากธรรมชาติ จึงนำมาพัฒนาเพื่อกักเก็บสารสกัดตัวไว้ในระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร (Nanostructured Lipid Carrier ; NLC) ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นไขมันแข็งและไขมันเหลว ทำให้โครงสร้างของ NLC มีลักษณะสัณฐานมีช่องว่างภายในให้สารสำคัญสามารถแทรกตัวเข้าไปกักเก็บไว้ในตัว อนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร มีข้อดีในการนำส่งตัวพาหรือสารสำคัญที่ติดกับระบบอื่น ๆ คือ ไขมันซึ่งเป็นส่วนประกอบในตัวรับทำให้พื้นที่ผิวของอนุภาคสูงขึ้นทำให้การยึดเกาะกับผิวผนังสูงขึ้น และสามารถทำให้เกิดการปกคลุมผิวเมื่อทาบบนผิวหนัง โดยผิวหนังจะมีความชุ่มชื้นสูงขึ้นและยังมีคุณสมบัติในการเพิ่มการแทรกผ่านผิวหนัง ทำให้การซึมผ่านของตัวพาหรือสารสำคัญปล่อยออกจากอนุภาคเพิ่มสูงขึ้น (Venugaranti *et al.*, 2009) และระบบ NLC จะช่วยลดการสลายตัวของสารสำคัญที่ไวต่อแสง ปฏิกริยาออกซิเดชัน และปฏิกริยาไฮโดรไลซิส นอกจากนี้ชนิดของไขมันชนิดของสารลดแรงตึงผิว การเติมสารด้านการเกิดออกซิเดชันในขั้นตอนการผลิตและสภาวะในการเก็บล้วนมีผลต่อความคงตัวของ NLC ที่เตรียมได้ ดังนั้นควรพิจารณาในการเลือกส่วนประกอบในการตั้งตัวรับเพื่อให้ได้ระบบนำส่งตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนเมตรในการนำส่งสารสำคัญของตัวให้มีประสิทธิภาพที่สุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย คือ เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดตัว พัฒนาสารสกัดตัวให้อยู่ในรูปแบบตัวพาไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร

วิธีการดำเนินการวิจัย

1.การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดตัว

โดยทดสอบด้วย Folin Test วัดการดูดกลืนแสงที่ 725 nm นำมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อเทียบหาปริมาณ Gallic acid ต่อน้ำหนักสารสกัดตัว 1 กรัม

2.การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัว

ใช้วิธีการทดสอบ DPPH assay วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀)

3.เตรียมสารสกัดตัวในระบบนำส่งตัวพา

ไขมันแข็งขนาดนาโน ด้วยวิธีหลอมด้วยความร้อน แยกหลอมที่ 90 °C โดยวัดภาคไขมัน ประกอบด้วย ไขมันแข็งคือ Glycerol monostearate (GMS), Compritol® 888 ATO (glyceryl behenate) ไขมันเหลว คือ Lexol® GT 865 และวัดภาคน้ำ ประกอบด้วย tween® 80, Lutrol® F68, สารสกัดตัว (CFF) จากนั้นปั่นผสมด้วย high speed homogenizer (13,000 rpm, 20 min) และลดขนาดด้วย Ultrasonic homogenizer

3.1) การวิเคราะห์คุณสมบัติของตัวรับ

โดยวัดขนาดอนุภาค (size), ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) และ ค่าศักย์ไฟฟ้า (zeta potential) ด้วยเครื่อง Zeta sizer

3.2) วิเคราะห์หาความสามารถในการกักเก็บ

สาร (% entrapment; %EE) โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge (13,000 rpm, 30 °C, 15 min) แยกเก็บส่วน Supernatant ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟอลิฟีนอลิกด้วยเครื่อง UV- spectrophotometer

3.3) วิเคราะห์หาสูตรตัวรับที่เหมาะสมโดยใช้

Response Surface Methodology (RSM) ใช้วิธีการทางสถิติ One-way ANOVA โดยการพิจารณาปัจจัยที่ส่งผลต่อลักษณะของตัวรับแบ่งเป็นตัวแปรต้น คือ ปริมาณไขมันแข็ง (X₁), ไขมันเหลว(X₂), สารก่อกอิมัลชัน(X₃: Tween + Lutrol), สารสกัดตัว(X₄) และตัวแปรตามคือ ขนาดอนุภาค (Y₁), ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Y₂), ค่าศักย์ไฟฟ้าของอนุภาค (Y₃), ร้อยละการกักเก็บสารสกัดตัวใน NLC (Y₄)

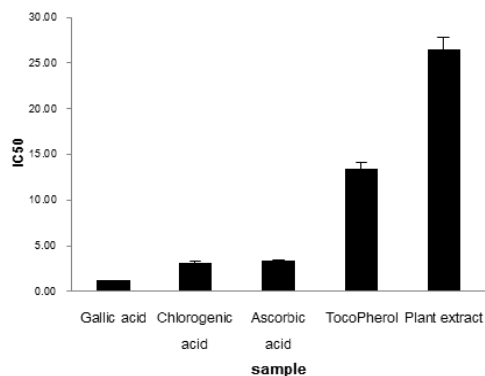
ผลการวิจัยศึกษา

1.การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกใน

สารสกัดตัว จากการทดลองได้กราฟมาตรฐานของ Gallic acid มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกันที่ $r^2 = 0.97$ ดังสมการ

$y=0.0795x+0.0109$ พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดตัว 139 mg/g

2.การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวด้วย DPPH สารสกัดตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ $IC_{50} = 26.49 \pm 1.27 \mu\text{g/ml}$

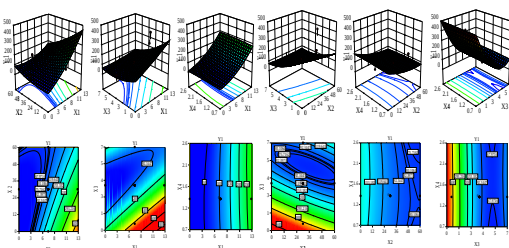


รูปที่ 1 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดตัวเทียบกับสารมาตรฐานต่างๆ

3.วิเคราะห์หาสูตรตำรับที่เหมาะสมโดยใช้

Response Surface Methodology (RSM) พบว่าสูตรตำรับ CFF-NLC ที่เหมาะสม คือ

- Compritol + GMS (1:1) 5.77 %w/w, Lexol 45 %w/w,
- Tween 80 + Lutrol (1:1) 3.3 %w/w, สารสกัด 2 %w/w
- ขนาดอนุภาค: $125.67 \pm 3.21 \text{ nm}$, ค่าการกระจายตัว: 0.158 ± 0.011 , ค่าศักย์ไฟฟ้า: $-11.20 \pm 0.40 \text{ mV}$,
- ร้อยละการกักเก็บสารสกัดตัวใน NLC: $57.58 \pm 3.14\%$



รูปที่ 2 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ RSM แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรต้นและตัวแปรตาม

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาพบว่าสารสกัดตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ $IC_{50} = 26.49 \pm 1.27 \mu\text{g/ml}$ โดยมีสูตรตำรับที่เหมาะสมจะใช้ไขมันในตำรับทั้งหมด 5% ประกอบด้วย GMS, Complitol, Lexol โดย Lexol ซึ่งเป็นไขมันเหลวจะให้ความเข้มข้น 30% ของไขมันทั้งหมด ส่วนสารสกัดใช้ความเข้มข้น 0.05% เนื่องจากทำให้ตำรับมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100-200 nm และมีปริมาณการกักเก็บสารสูงมากพอที่จะนำไปยังอวัยวะเป้าหมายได้

บทที่เหมาะสมโดยใช้จากการวิเคราะห์หาสูตรตำรับที่พบคำตอบ RSM พบว่าส่วนประกอบในตำรับที่เหมาะสมมีสัดส่วนดังนี้ คือ Compritol + GMS (1:1) 5.77 %w/w, Lexol 45 %w/w, Tween 80 + Lutrol (1:1) 3.3 %w/w สารสกัด 2 %w/w ซึ่งให้ค่าขนาดอนุภาคเท่ากับ $125.67 \pm 3.21 \text{ nm}$, ค่าการกระจายอนุภาคเท่ากับ 0.158 ± 0.011 ศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเท่ากับ $-11.20 \pm 0.40 \text{ mV}$ และร้อยละการกักเก็บสารฟีนอลิกเท่ากับ 57.58 ± 3.14

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการ "สร้างปัญญาวิทย์ ผลิตนักเทคโนโลยี (Young Scientist and Technologist Programme : YSTP) " ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้สนับสนุนการทำวิจัย (สวทช.) ที่ให้ทุนสนับสนุน

References

- Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burger HJ, *et al.* 1997. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 339: 315-322.
- Bassoli BK, Cassolla P, Borba-Murad GR, Constantin J, Salgueiro-Pagadigorria CL, *et al.* 2008. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: Effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function* 26: 320-328. Clifford MN. 2000.

- Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1033-1043.
- Sripanidkulchai K., Teepsawang S., and Sripanidkulchai B. 2010. *Journal of Medicinal Food*.13(5): 1097-1103.
- Kukongviriyapan U, Luangaram S, Leekhaosong K, Kukongviriyapan V, Preeprame S. 2007. Antioxidant and vascular protective activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30: 611-666.
- Maisuthisakul P, Pongsawatmanit R, Gordon MH. 2007. Characterization of the phytochemical and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). *Food Chemistry* 100: 1620-228.
- McCarty MF. 2005. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Medical Hypotheses* 64: 848-853.
- Venuguranti VV, Perumal OP, Chapter 9, Nanosystems for Dermal and Transdermal Drug Delivery, In: Pathak Y, Thassu D. *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. New York: Informa Healthcare USA, Inc., .55-2009:126