

Thesis Title Development of *Tabernaemontana divaricata* Extract Loaded Transdermal Delivery System by Microemulsion for Cholinesterase Inhibitory Activities

Author Miss Wantida Chaiyana

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Wirat Niwatananun	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Kornkanok Ingkaninan	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Co-advisor
Prof. Dr. Thomas Rade	Co-advisor

ABSTRACT

The aim of this research thesis study was to develop the *Tabernaemontana divaricata* alkaloidal extract loaded transdermal delivery system by microemulsion which is able to inhibit the enzyme associated with Alzheimer's disease. Acetylcholinesterase terminates the transmission of nerve impulse by rapid hydrolysis of acetylcholine. Inhibition of acetylcholinesterase will enhance the acetylcholine level and therefore be one of the most promising approaches for treating Alzheimer's disease. Since most of current Alzheimer's drugs cannot cease the disease accompanying with their adverse effects, it necessitates the interest in finding better acetylcholinesterase inhibitor and better way to deliver these compounds.

T. divaricata, used in traditional Thai rejuvenation remedies as a neurotonic, would be a good candidate for finding new cholinesterase inhibitor. Alkaloids, its major constituents, possess high acetylcholinesterase inhibition with IC₅₀ value of 131.17±20.06 ng/mL. Beside the equivalent anti-acetylcholinesterase activity as galantamine, the most obvious finding to emerge from this study is the higher selectivity on acetylcholinesterase. Morris water maze test revealed the same potential in cognitive enhancement of transdermal *T. divaricata* alkaloidal extract in propylene glycol (1,000 and 500 mg/kg) as oral galantamine (1 mg/kg).

Since the *T. divaricata* alkaloidal extract is natural mixtures, the qualitative control was done by the mean of thin layer chromatography and high performance liquid chromatography fingerprints. The bisindole alkaloid, 3'-*R/S*-hydroxyvoacamine, was purified and used as a reference marker in the quantification.

The preformulation study was undertaken by the means of physicochemical properties, stability and cytotoxicity. The calculated log *P* value was 3.03±0.07 which was in an acceptable range of drug candidates for the passive transdermal delivery. T_g of *T. divaricata* alkaloidal extract was at 48.67°C and the decompositions were occurred after exposure to very high temperature (150.86°C). The cytotoxicity study by tetrazolium-based colorimetric assay revealed its safety on peripheral blood mononuclear cell with 46 times higher IC₅₀ against the cell than acetylcholinesterase.

Regarding to microemulsion development, pseudoternary phase diagrams were constructed and the findings suggested that oil types, surfactant types, co-surfactant types and surfactant to co-surfactant ratio influenced microemulsion region in the phase diagrams while pH and ionic strength of aqueous phase had no effect. The selected microemulsions were characterized by means of photon correlation

spectroscopy, polarizing light microscopy, freeze fracture transmission electron microscopy, differential scanning calorimetry, electrical conductivity and rheology. The system comprising *Z. cassumunar* oil, Triton X-114, ethanol and water was selected for incorporation of 5 mg/mL *T. divaricata* alkaloidal extract. The concurrence of various characterizations suggested that reverse micellar phase, liquid crystal and coarse emulsion were formed along dilution line A (oil:Smix = 1:5) and dilution line B (oil:Smix = 2:5).

A4, A6 and B4 were selected to be representatives of microemulsion, B6 was selected as a representative of liquid crystal, and A8 was selected as a representative of liquid crystal in microemulsion in further in-depth studies. Encapsulation of the *T. divaricata* alkaloidal extract in microemulsions, liquid crystalline system and liquid crystal in microemulsion exhibited higher stability after 180 day storage in various temperatures when compared with the propylene glycol solution. Moreover, both microemulsions and liquid crystalline system show an enhancing effect on skin permeation of *T. divaricata* alkaloidal extract. These results were in a good agreement with the skin retention results. The cumulative amount of the *T. divaricata* alkaloidal extract per unit area of skin that has passed through the skin after 24 hours of B4 and B6 were 0.37 ± 0.20 and 0.54 ± 0.28 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively.

Form all of the above results, it was concluded that *T. divaricata* alkaloidal extract loaded microemulsions which comprising *Z. cassumunar* oil, Triton X-114, ethanol and water was able to be delivered via transdermal route and possess acetylcholinesterase inhibitory activity. With the further development to transdermal patch, it would be probably considered as a potential formulation for further use in the treatment of Alzheimer's disease.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบนำส่งยาผ่านผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดพุดจิบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลินเอสเทอเรส	
ผู้เขียน	นางสาว วรริศา ชัยญาณะ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ศิริพร โอโกโนกิ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร. วิรัตน์ นิวัฒน์นันท์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ.ดร. กรรณก อิงคินันท์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเสวต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ. ดร. โทมัส ราเดส	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์นี้ เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาผ่านผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดพุดจิบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ เอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสสามารถยุติการส่งผ่านสัญญาณประสาทโดยการสลายสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลินอย่างรวดเร็ว การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสจึงช่วยเพิ่มปริมาณของอะเซทิลโคลินดังกล่าว และเป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้เกิดผลดีสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ แต่เนื่องจากยาที่ใช้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันยังไม่สามารถยุติโรคนี้ได้และยังมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา จึงเป็นเหตุจำเป็นที่จะต้องให้ความสนใจกับการค้นคว้าหาตัวใหม่ๆ ที่จะสามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสได้ดีกว่าเดิม และหาวิธีการที่ดีกว่าในการนำส่งสารดังกล่าว

พุดจิบซึ่งถูกนำมาใช้ในตำรับยาบำรุงระบบประสาทของไทยตั้งแต่สมัยโบราณเป็นตัวเลือกหนึ่งสำหรับการค้นคว้าหาสารที่จะมายับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส อัลคาลอยด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากพุดจิบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสได้เป็นอย่างดี โดยสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบที่ความเข้มข้น 131.17 ± 20.06 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 และนอกเหนือจากสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสได้ดีเทียบเท่ากับ

ยากาแลนตามีนแล้ว ยังพบว่าสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบยังมีความไวต่อเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสมากกว่ายากาแลนตามีนอีกด้วย จากการทดสอบด้วยวิธีมอร์ริสวอเตอร์เมสพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบผ่านทางผิวหนัง (1,000 และ 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) มีความสามารถในการเรียนรู้ที่จะขึ้นจากน้ำไปอยู่บนแท่นได้ดีเทียบเท่ากับหนูทดลองที่กินยากาแลนตามีน (1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม)

เนื่องจากอัลคาลอยด์จากพุดจิบเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ดังนั้นจึงได้ทำการควบคุมคุณภาพโดยใช้การพิมพ์ลายนิ้วมือสารทั้งแบบโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางและโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ในการหาปริมาณของสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบได้ใช้ 3'-R/S-ไฮดรอกซีไวอาคามีนเป็นสารมาตรฐาน

ก่อนการพัฒนาตำรับ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ความคงตัว และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบ ค่า $\log P$ ที่คำนวณได้เท่ากับ 3.03 ± 0.07 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้สำหรับยาที่จะนำไปใช้ผ่านทางผิวหนัง ส่วนอุณหภูมิที่จับของสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบอยู่ที่ 48.67 องศาเซลเซียส และพบว่าสารสกัดเกิดการสลายตัวหลังจากอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 150.86 องศาเซลเซียส ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบซึ่งทดสอบโดยวิธี tetrazolium-based colorimetric assay ได้แสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยของสารสกัดต่อเซลล์เม็ดเลือด (PBMC) เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตเหลืออยู่ร้อยละ 50 มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ร้อยละ 50 ถึง 46 เท่า

ในการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมได้ถูกสร้างขึ้น และผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ชนิดของน้ำมัน ชนิดของสารลดแรงตึงผิว ชนิดของสารช่วยสารลดแรงตึงผิว และสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อสารช่วยสารลดแรงตึงผิวมีบทบาทต่อพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันในแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่าง และความแรงประจุของน้ำไม่มีผลกระทบใดๆ คุณสมบัติของตำรับที่ถูกเลือกได้ถูกตรวจสอบโดยเครื่องวัดขนาดอนุภาคกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงโพลาไรซ์ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชนิดฟริชแพรงเจอร์ เครื่องดีฟเฟอเรนเชียลสแกนิงแคลอริมิเตอร์ เครื่องวัดนำไฟฟ้า และเครื่องวัดการไหล ตำรับที่ประกอบไปด้วยน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าของไพล ไตรตอนเอ็กซ์-114 เอทานอล และน้ำ ได้ถูกรวมเข้ากับสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบโดยใช้ความเข้มข้นที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆข้างต้น ทำให้ทราบว่าเกิดไมเซลล์ผันกลับ ลิวติคริสตัล และอิมัลชันหยาดบนเส้น A (น้ำมัน:สารลดแรงตึงผิวผสม = 1:5) และเส้น B (น้ำมัน:สารลดแรงตึงผิวผสม = 2:5)

ตำรับ A4 A6 และ B4 ถูกเลือกให้เป็นตัวแทนของไมโครอิมัลชัน ในขณะที่ B6 ถูกใช้เป็นตัวแทนของลิวคิวคิสต์ และ A8 เป็นตัวแทนของลิวคิวคิสต์ในไมโครอิมัลชัน สำหรับการศึกษาในเชิงลึกขั้นต่อไป การใส่สารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบในตำรับไมโครอิมัลชัน ลิวคิวคิสต์ และลิวคิวคิสต์ในไมโครอิมัลชัน ส่งผลให้ความคงตัวของสารสกัดดีขึ้นหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 180 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายของสารสกัดในโพรพิลีนไกลคอล นอกจากนี้ ทั้งตำรับไมโครอิมัลชันและลิวคิวคิสต์ยังสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบได้ ซึ่งผลการซึมผ่านผิวหนังดังกล่าวก็สอดคล้องกับผลการสะสมของสารสกัดในผิวหนัง โดยปริมาณสะสมของสารสกัดอัลคาลอยด์จากพุดจิบต่อหน่วยพื้นที่ของผิวหนังที่ผ่านผิวหนังหลังจาก 24 ชั่วโมงของตำรับ B4 และ B6 เท่ากับ 0.37 ± 0.20 และ 0.54 ± 0.28 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรตามลำดับ

จากผลการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าของไพล ไตรตอนเอ็กซ์-114 เอทานอล และน้ำ ของสารสกัดพุดจิบสามารถให้นำส่งยาทางผิวหนังได้ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิล โคลีนเอสเทอเรส และหากมีการพัฒนาต่อไปให้อยู่ในรูปแบบแปะผิวหนัง ก็อาจนำไปพิจารณาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ในอนาคต