

**Thesis Title** Development of Nanoparticles Containing Bioactive Compound  
of *Psidium guajava* Leaves

**Author** Mr. Witayapan Nantitanon

**Degree** Doctor of Philosophy (Pharmacy)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi Advisor

Assoc. Prof. Dr. Jakkapan Sirithunyalug Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Sombat Chowwanapoonpohn Co-advisor

**ABSTRACT**

The aims of this study are to investigate the influence of certain factors on antioxidant activity and anticancer activity of *Psidium guajava* leaf extract and enhance solubility, stability of the extract using nanotechnology. The physicochemical property, antioxidant and anticancer properties of the extract loaded nanoparticles were also evaluated.

First of all, the effects of blanching and drying (pretreatment) of leaf sample prior to extract, extraction method, and the leaf age were investigated. Results indicated that extract of *P. guajava* young leaf obtained from treating the leaves with blanching followed by ice water cooling (BCD), dried at 50 °C before ultrasonic extraction using ethyl alcohol as extracting solvent (YGEt) gave attractive antioxidant activity based on ferric chelating and hydroxyl scavenging mechanisms with

IC<sub>50</sub> values of 9.5±0.7 and 10.1±1.6 µg/mL, respectively. The extract showed intracellular ROS scavenging of 163.6±19.5 µM quercetin equivalent/g extract.

More interestingly, YGEt showed inhibitory activity against prostate DU145 and leukemic Molt4 cancer cells with IC<sub>50</sub> value of 37.4±2.4 and 81.8±2.0 µg/mL respectively. Additionally, it possessed total phenolic content as gallic acid equivalent (GAE) and flavonoid content as quercetin equivalent (QE) of 162.9±6 and 190.8±4.1 mg/g extract, respectively. The HPLC analysis indicated that YGEt composed of gallic acid, ellagic acid, and quercetin in the amount of 3.67±0.12, 13.82±0.34, and 26.12±0.98 mg/g extract, respectively. Interestingly, this extract showed no toxicity to PBMCs normal cells. Unfortunately, YGEt showed very low solubility in PBS (4.10±0.09 µg QE/mL), leading to drawback for use in clinical application.

In this study, nano delivery system based on chitosan ionotropic method and mPEG-*b*-p(HPMAM-Lac<sub>2</sub>) polymeric micelles were prepared to deliver quercetin (QT), a bioactive compound of *P. guajava* leaf extract due to their biodegradable and biocompatible properties. It was found that QT was successfully entrapped in both nano delivery systems. However, nano delivery system based on mPEG-*b*-p(HPMAM-Lac<sub>2</sub>) micelles showed higher enhancement of QT solubility and entrapment efficiency. It was found that, the entrapment efficiency (%EE) of QT loaded mPEG-*b*-p(HPMAM-Lac<sub>2</sub>) micelles was 33.3±0.4 % . The solubility of QT loaded mPEG-*b*-p(HPMAM-Lac<sub>2</sub>) micelles in PBS was found to be 350 µg/mL, about 35 times higher than QT intact. Size analysis indicated that the average particle size of these nanoparticles was 92±4 nm with PDI of 0.23. QT loaded mPEG-*b*-p(HPMAM-Lac<sub>2</sub>) micelles showed significantly higher ROS scavenging than native QT over a

period of 72 h. The  $IC_{50}$  value of QT loaded mPEG-b-p(HPMAM-Lac<sub>2</sub>) micelles was  $46.9 \pm 2.8$   $\mu\text{g/mL}$  whereas free QT exhibited higher  $IC_{50}$  value of  $63.8 \pm 3.3$   $\mu\text{g/mL}$ .

Entrapment of crude extract like YGEt into mPEG-b-p(HPMAM-Lac<sub>2</sub>) micelles showed the maximum of a loading efficiency of  $64.9 \pm 6.1$  %. It was found that the solubility in PBS of YGEt loaded micelles (YGEtPM) was  $247.3 \pm 4.1$   $\mu\text{g}$  flavonoid QT /mL, approximately 60 times higher than QT intact. YGEtPM exhibited smaller particle size of 115 nm with PDI of 0.25. YGEtPM showed intracellular ROS scavenging with  $IC_{50}$  of  $66.3 \pm 2.8$   $\mu\text{g/mL}$ . This activity was slightly lower than that of the intact YGEt. These results might be due to the shortly time of investigation (30 min). However, after treat DU145 cancer cell with YGEtPM for 48 h, the finding indicated that YGEtPM inhibited the growth of DU145 prostate cell lines with  $IC_{50}$  values of  $26.9 \pm 3.6$   $\mu\text{g/mL}$ , which significant higher activity than YGEt intact ( $IC_{50}$  value of  $37.4 \pm 2.4$   $\mu\text{g/mL}$ ). Interestingly, YGEtPM did not show any cytotoxicity on PBMCs normal cells. It could be concluded that YGEtPM should be a promising agent to inhibit intracellular ROS radicals and preventing prostate DU145 disease.

|                                |                                                  |                      |
|--------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------|
| ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์          | การพัฒนาอนุภาคนาโนของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากใบฝรั่ง |                      |
| ผู้เขียน                       | นายวิทยาพันธ์ นันติตานนท์                        |                      |
| ปริญญา                         | วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)              |                      |
| คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ |                                                  |                      |
|                                | รศ.ดร. ศิริพร โอโกโนกิ                           | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
|                                | รศ.ดร. จักรพันธ์ ศิริชัยญาลักษณ์                 | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
|                                | ผศ.ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเสวต                        | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
|                                | ผศ.ดร.สมบัติ เขาวานพูนผล                         | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

### บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากใบฝรั่ง และเพิ่มสมบัติการละลายและความคงตัวของสารสกัดที่น่าสนใจจากใบฝรั่งโดยใช้นาโนเทคโนโลยี และทำการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่กักเก็บในอนุภาคนาโน

ลำดับแรก ผลของการเตรียมใบฝรั่งด้วยการลวก การให้ความร้อนก่อนการสกัด วิธีการสกัด และความแก่อ่อนของใบฝรั่ง ได้ถูกนำมาศึกษา ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า ผงแห้งของใบอ่อนฝรั่งที่ได้จากการลวกแล้วทำให้เย็นด้วยน้ำแข็ง อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สกัดโดยใช้แรงสั่นสะเทือนจากคลื่นความถี่ต่ำ และใช้เอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ กล่าวคือ สารสกัดดังกล่าวสามารถให้อิเล็กตรอนแก่เหล็กที่มีประจุสองบวก และจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซี ลดลงร้อยละห้าสิบ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารดังกล่าว  $9.5 \pm 0.7$  และ  $10.1 \pm 1.6$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนั้น สารสกัดดังกล่าว ยังสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระประเภทออกซิเจนที่สามารถเกิดขึ้นในเซลล์ เทียบเท่ากับความสามารถของสารเคอร์ซีติน ที่ความเข้มข้น  $163.6 \pm 19.5$  ไมโครโมลต่อสารสกัด 1 กรัม

ที่น่าสนใจมากกว่านั้น สารสกัดดังกล่าว ยังแสดงความสามารถในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ชนิด DU145 และเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Molt 4 โดยที่ความเข้มข้น  $37.4 \pm 2.4$  และ  $81.8 \pm 2.0$  ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าว ตามลำดับได้ร้อยละ 50 และยังพบอีกว่า สารสกัดดังกล่าว 1 กรัม มีปริมาณเทียบเท่า กรดแกลลิก และ เคอร์ซีติน  $169.6 \pm 6$  และ  $190.8 \pm 4.1$  มิลลิกรัม ตามลำดับ การวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าสารสกัดดังกล่าว 1 กรัม มีปริมาณ กรดแกลลิก กรด แอลลาจิก และ เคอร์ซีติน เท่ากับ  $3.67 \pm 0.12$ ,  $13.82 \pm 0.34$  และ  $26.12 \pm 0.98$  มิลลิกรัม ตามลำดับ สารสกัดดังกล่าวไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เมื่อทำการทดสอบด้วยเซลล์ปกติของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว แต่กระนั้นก็ตาม สารสกัดดังกล่าวให้ค่าการละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ในปริมาณเทียบเท่า สารเคอร์ซีติน เพียงแค่  $4.10 \pm 0.09$  ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งทำให้เป็นอุปสรรคต่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านคลินิก

ในการศึกษาครั้งนี้ ระบบนำส่งนาโน บนพื้นฐานของวิธี ไอโอโนโทรปิก โคโตซาน และ mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac)<sub>2</sub> ไมเซลล์ ถูกนำมาเป็นต้นแบบสำหรับนำส่งสารสกัดที่น่าสนใจจากใบฝรั่ง เนื่องจาก สองวิธีดังกล่าวใช้โพลิเมอร์ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์ เคอร์ซีตินซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่พบในสารสกัดใบฝรั่งถูกใช้เป็นสารประกอบต้นแบบในการประเมินระบบนำส่งนาโนของทั้งสองวิธี ผลการทดลอง พบว่า ระบบนำส่งนาโน ทั้งสองสามารถกักเก็บเคอร์ซีตินได้ แต่พบว่าระบบ mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac)<sub>2</sub> ไมเซลล์ สามารถเพิ่มค่าการละลายของเคอร์ซีติน และมีประสิทธิภาพในการบรรจุเคอร์ซีติน ได้มากกว่า นอกจากนี้ระบบไมเซลล์ ยังสามารถผลิตอนุภาคนาโนให้มีขนาดเพียง 100 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กพอที่จะนำส่งเข้าสู่เซลล์โดยผ่านกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ได้โดยไม่ถูกกำจัด พบว่าระบบนี้สามารถกักเก็บ เคอร์ซีตินได้ถึงร้อยละ  $33.4 \pm 0.4$  และพบว่า เคอร์ซีตินที่ถูกกักเก็บในระบบไมเซลล์นี้สามารถละลายในบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 โดยประมาณ เท่ากับ 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งสามารถเพิ่มค่าการละลายได้ถึง 34.5 เท่า เมื่อเทียบกับ สารเคอร์ซีตินในรูปแบบปกติ พบว่า เคอร์ซีตินที่ถูกกักเก็บในไมเซลล์มีอนุภาคเฉลี่ย เท่ากับ  $92 \pm 4$  นาโนเมตร และมีค่าการกระจายตัวของอนุภาค เท่ากับ 0.23 เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระประเภทออกซิเจน ที่อยู่ในเซลล์ พบว่า อนุภาคไมเซลล์ของเคอร์ซีติน แสดงศักยภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระดังกล่าว ได้ดีกว่า เคอร์ซีตินในรูปแบบปกติ ตลอดจนเสร็จสิ้นการทดลองที่ 72 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด DU 145 พบว่า อนุภาคไมเซลล์ของเคอร์ซีติน ให้ค่าการยับยั้งเซลล์

ดังกล่าวลดลงร้อยละ 50 โดยใช้ความเข้มข้น เท่ากับ  $46.9 \pm 2.8$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ เคอร์ซีตินในรูปแบบปกติ ต้องใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า คือ  $63.8 \pm 3.3$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการกักเก็บสารสกัดหยาบใบฝรั่ง พบว่า mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac)<sub>2</sub> ไมเซลล์ สามารถ กักเก็บสารสกัดหยาบใบฝรั่งได้สูงสุดถึงร้อยละ  $64.9 \pm 6.1$  และสามารถละลายในบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ได้เท่ากับ  $247.27 \pm 4.1$  ไมโครกรัมของเคอร์ซีตินต่อมิลลิลิตร (60 เท่า ของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง ใน รูปแบบปกติ) พบว่าอนุภาคไมเซลล์ของสารสกัดใบฝรั่งมีขนาดเท่ากับ  $115 \pm 6$  นาโนเมตร และมีค่า การกระจายตัวของอนุภาค เท่ากับ 0.25 เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ประเภทออกซิเจนที่เกิดขึ้นในเซลล์ และความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด D145 พบว่า ไมเซลล์ของสารสกัดดังกล่าว สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระข้างต้น ลดลงร้อยละ 50 เมื่อ ใช้ความเข้มข้น เท่ากับ  $66.3 \pm 2.8$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่า เมื่อเทียบกับ สารสกัดในรูปแบบปกติ ผลที่ได้เช่นนี้เนื่องจาก เวลาในการทดลองอาจจะสั้นเกินไป (30 นาที) ทำให้ไม่สามารถประเมินศักยภาพที่แท้จริงของสารสกัดในรูปแบบไมเซลล์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังกล่าว อย่างไรก็ตามเมื่อดูผลของการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก โดยใช้เวลาศึกษา 48 ชั่วโมง พบว่า ไมเซลล์ของสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ชนิด DU145 ลดลงร้อยละ 50 โดยใช้ความเข้มข้น เท่ากับ  $26.9 \pm 3.6$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดดังกล่าวใน รูปแบบปกติ ต้องใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า คือ  $37.4 \pm 2.4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่น่าสนใจ สาร สกัดที่ถูกกักเก็บใน mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac)<sub>2</sub> ไมเซลล์ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เมื่อ ทดสอบด้วย เซลล์ PBMCs โดยสรุปอาจกล่าวได้ว่า สารสกัดใบฝรั่งที่ถูกกักเก็บใน mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac)<sub>2</sub> ไมเซลล์ เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ และใช้ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด DU 145