

Thesis Title	Entrapment of Fatty Acid Esters in Niosomes for Canities Treatment	
Author	Ms. Puxvadee Chaikul	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Aranya Manosroi	Advisor
	Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Co-advisor
	Prof. Dr. Masahiko Abe	Co-advisor

ABSTRACT

This study aimed to develop the topical hair lotion containing fatty acid ester loaded in niosomes for canities treatment. Four saturated fatty acid methyl esters including lauric acid methyl ester (LM), myristic acid methyl ester (MM), palmitic acid methyl ester (PM) and stearic acid methyl ester (SM), were synthesized by the Fischer esterification reaction and investigated for cell cytotoxicity and melanogenesis stimulation in B16F10 melanoma cells in comparing to their corresponding saturated fatty acids. For cell cytotoxicity by sulforhodamine B assay, all methyl esters, lauric acid (LA) and myristic acid (MA) at 2.5 to 50.0 $\mu\text{g/ml}$ demonstrated high cell viability (>80%), while palmitic acid (PA) and stearic acid (SA) at 25.0 and 50.0 $\mu\text{g/ml}$ gave moderate cytotoxicity. In melanogenesis stimulation assay, MM at 50.0 $\mu\text{g/ml}$ exhibited the highest melanin content and tyrosinase activity of 1.58 and 1.67 folds of the control, respectively. Also, MM

demonstrated the melanin stimulation almost equal to theophylline, a positive control, at 10.0 $\mu\text{g/ml}$. MM was selected to load in niosomes. Three charged niosomes, including neutral (Brij72/cholesterol at 7:3), cationic (Brij72/cholesterol/dimethyl dioctadecyl ammonium bromide at 7:3:0.65) and anionic niosomes (Brij72/cholesterol/dicetyl phosphate at 7:3:0.65), were loaded with MM and evaluated for physicochemical characteristics and *in vitro* cytotoxicity as well as the melanogenesis induction activity. The maximum loading and percentage entrapment of MM were 4.5, 90.68 \pm 7.95 in neutral; 11.0, 92.54 \pm 6.32 in cationic and 0.1% w/w, 74.43 \pm 1.86% in anionic niosomes, respectively. All blank and MM loaded niosomes were in unilamellar structure under transmission electron microscope and in the nanosize at initial and after the 3-month storage at various temperatures. The remaining percentages of MM loaded in neutral, cationic and anionic niosomes when kept at 4 \pm 2, 30 \pm 2 and 45 \pm 2°C for 3 months were about 82, 74 and 72%, respectively, while the dry MM indicated 97.82 \pm 1.74, 96.56 \pm 2.91 and 91.39 \pm 4.32%, respectively. Blank neutral, blank cationic and MM loaded in neutral and cationic niosomes showed cell viability of fibroblasts and B16F10 melanoma cells at 56.64 \pm 3.19, 59.72 \pm 1.51; 73.81 \pm 2.86, 82.51 \pm 0.20; 47.34 \pm 2.13, 52.67 \pm 2.78 and 73.20 \pm 3.49, 84.34 \pm 2.75%, respectively. Blank anionic and MM loaded in anionic niosomes demonstrated no cytotoxicity in both cells. According to the cytotoxic ratio of cell viability in normal and cancer cells, all niosomes indicated no toxic effect on normal cells. Cationic niosomes loaded with MM at 34.80 μM (8.43 $\mu\text{g/ml}$) demonstrated the highest melanin induction with the tyrosinase activity of 1.42 and 1.70 folds of the control and 1.14 and 1.59 folds higher than theophylline, respectively. Also, for transfollicular penetration using vertical Franz diffusion cells, the cationic niosomes

loaded with MM exhibited higher cumulative amounts of MM than that loaded in neutral and anionic niosomes of 1.09, 1.21 and 1.15, 1.23 times, respectively, both in skin and receiver compartment. The cationic niosomes loaded with MM were selected to incorporate in the hair lotion. Hair lotion containing MM loaded in cationic niosomes was developed and investigated for physical appearances, transfollicular penetration and *in vivo* skin irritation as well as the melanogenesis induction activity in comparing to MM not loaded in cationic niosomes. All hair lotions showed good physical appearances. The remaining percentages of MM loaded in cationic niosomes when incorporated in the hair lotion were higher than that not loaded in cationic niosomes at all storage temperatures (4 ± 2 , 30 ± 2 and $45\pm 2^\circ\text{C}$) for 3 months. Transfollicular penetration of MM loaded in cationic niosomes incorporated in the hair lotion showed higher cumulative amounts and fluxes than that not loaded in cationic niosomes of 1.45 and 1.32 times in skin and receiver compartment, respectively. The *in vivo* skin irritation in rabbit of the hair lotions containing MM loaded and not loaded in cationic niosomes indicated slight irritation. For *in vivo* melanogenesis induction in aged (9-month-old) mice for 2 months, the peak of the skin and hair pigmentation was first observed in the hair lotion containing MM loaded in cationic niosomes, indicating the enhanced penetration of MM loaded in niosomes. Meanwhile, the peak pigment recovery of hair lotion containing theophylline was slowly observed after 56 treatment days, due to the low tyrosinase activity in the aged mice. This study has demonstrated the potential of cationic niosomes for MM to increase the stability, the transfollicular penetration and the recovery of the skin and hair pigmentation in the aged mice which will be beneficial for the development as a topical anti-canities product.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเก็บกักเอสเทอร์ของกรดไขมันในนีโอโซมเพื่อใช้รักษาภาวะผมขาว	
ผู้เขียน	นางสาว ภักดี ไชยกุล	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ศ. ดร. จีระเดช มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ. ดร. มาชาฮีโกะ อาเบะ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับโลชันทาเฉพาะที่โดยมีเอสเทอร์ของกรดไขมันเก็บกักในนีโอโซมเพื่อใช้รักษาภาวะผมขาว ได้สังเคราะห์อนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัว 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ เมซิลเอสเทอร์ของกรดลอริก เมซิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติก เมซิลเอสเทอร์ของกรดปาล์มิติก และเมซิลเอสเทอร์ของกรดสเตียริก โดยปฏิกิริยาฟิชเชอร์เอสเทอร์ฟิเคชันและประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์และการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนัง (B16F10) เปรียบเทียบกับกรดไขมันอิ่มตัวที่ใช้ในการสังเคราะห์ จากการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้สัซัลโฟโรดามีนบี พบว่าอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวทั้ง 4 ชนิด กรดลอริก และกรดไมริสติก ที่ความเข้มข้น 2.5 - 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่กรดปาล์มิติกและกรดสเตียริกที่ความเข้มข้น 25.0 และ 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปานกลาง ส่วนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน เมซิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกที่ความเข้มข้น 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด มีค่า 1.58 และ 1.67 เท่าของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ นอกจากนี้ เมซิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกยังกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานธิโอฟิลินที่ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเมซิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกมาเก็บกักในนีโอโซม ได้เตรียมเมซิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกเก็บกักในนีโอโซมที่มีประจุแตกต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ ชนิดไม่มีประจุที่ประกอบด้วยบริดจ์ 72 และโคเลสเตอรอล ในอัตราส่วน 7 ต่อ 3, ชนิดประจุบวกที่

ประกอบด้วยบริดจ์ 72 โกลเดสเตอร์และไดเมซิลไดออกตะดิซิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ในอัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 0.65 และชนิดประจุลบที่ประกอบด้วยบริดจ์ 72 โกลเดสเตอร์และไดซิลฟอสเฟต ในอัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 0.65 ได้ประเมินลักษณะทางกายภาพ ความเป็นพิษและการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในหลอดทดลอง ปริมาณสูงสุดและเปอร์เซ็นต์การเกิดกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกในนีโอโซมชนิดไม่มีประจุ ชนิดประจุบวก และชนิดประจุลบ ซึ่งมีค่า 4.5, 90.68 ± 7.95 ; 11.0, 92.54 ± 6.32 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก, 74.43 ± 1.86 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นีโอโซมเปล่าและนีโอโซมที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกมีรูปร่างกลมที่ประกอบด้วยผนังชั้นเดียวเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และมีขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตรหลังเตรียมใหม่และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน เปอร์เซ็นต์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกที่เหลืออยู่ในนีโอโซมเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 2 , 30 ± 2 และ 45 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน มีค่าประมาณ 82, 74 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกแบบแห้ง มีเหลืออยู่ 97.82 ± 1.74 , 96.56 ± 2.91 และ 91.39 ± 4.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นีโอโซมเปล่าชนิดไม่มีประจุ ชนิดประจุบวก และนีโอโซมที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกชนิดไม่มีประจุ และชนิดประจุบวก มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์และมะเร็งผิวหนัง (B16F10) เท่ากับ 56.64 ± 3.19 , 59.72 ± 1.51 ; 73.81 ± 2.86 , 82.51 ± 0.20 ; 47.34 ± 2.13 , 52.67 ± 2.78 และ 73.20 ± 3.49 , 84.34 ± 2.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนนีโอโซมเปล่าชนิดประจุลบและนีโอโซมที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกชนิดประจุลบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด สำหรับอัตราส่วนความเป็นพิษของเซลล์ปกติกับเซลล์มะเร็ง พบว่านีโอโซมทุกชนิดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ส่วนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน พบว่านีโอโซมชนิดประจุบวกที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกความเข้มข้น 34.80 ไมโครโมลาร์ (8.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด เท่ากับ 1.42 และ 1.70 เท่าของกลุ่มควบคุม และมีค่าสูงกว่าสารมาตรฐานทีโอฟิลลิน 1.14 และ 1.59 เท่าตามลำดับ นอกจากนี้ การทดสอบการนำส่งสารผ่านเซลล์รุกรามของนีโอโซมชนิดประจุบวกที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติก พบว่าปริมาณสะสมของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกมีค่ามากกว่าในนีโอโซมชนิดไม่มีประจุและชนิดประจุลบที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติก 1.09, 1.21 และ 1.15, 1.23 เท่า ในหนังหมูและรีซีฟเวอร์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกนีโอโซมชนิดประจุบวกที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกมาพัฒนาเป็นตำรับโลชันสำหรับผม ได้พัฒนาตำรับโลชันสำหรับผมที่มีนีโอโซมชนิดประจุบวกที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกและนำมาประเมินลักษณะทางกายภาพ การนำส่งสารผ่านเซลล์รุกราม การระคายเคือง และการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในสัตว์ทดลองเปรียบเทียบกับตำรับโลชันสำหรับผมที่มีเมธิลเอสเทอร์ของ

กรดไมริสติกที่ไม่เก็บกักในนีโอโชมชนิดประจุบวก พบว่าตำรับโลชันสำหรับผมทุกตำรับมีความคงตัวทางกายภาพดี มีเปอร์เซ็นต์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกที่เหลืออยู่ในตำรับโลชันสำหรับผมที่มีนีโอโชมชนิดประจุบวกเก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกสูงกว่าในตำรับโลชันสำหรับผมที่มีเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกที่ไม่เก็บกักในนีโอโชมชนิดประจุบวกเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (4±2, 30±2 และ 45±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 เดือนการทดสอบนำส่งเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกผ่านเซลล์รูขุมขนของตำรับโลชันสำหรับผม พบว่าปริมาณสะสมและอัตราเร็วในการซึมผ่านของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกจากตำรับที่มีนีโอโชมชนิดประจุบวกที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกสูงกว่าตำรับที่มีเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกที่ไม่เก็บกักในนีโอโชมชนิดประจุบวก 1.45 และ 1.32 เท่า ตามลำดับ สำหรับการทดสอบการระคายเคืองในผิวหนังกระต่ายของตำรับโลชันสำหรับผมที่มีเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโชมชนิดประจุบวก พบว่าทั้งสองตำรับก่อให้เกิดการระคายเคืองเพียงเล็กน้อย ส่วนการทดสอบการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในหนูแก่อายุ 9 เดือน เป็นเวลา 2 เดือน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสูงสุดของผิวหนังและขนของหนูในกลุ่มที่ทำตำรับโลชันสำหรับผมที่มีนีโอโชมชนิดประจุบวกที่เก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกเร็วกว่ากลุ่มที่ทำตำรับโลชันสำหรับผมอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารของนีโอโชมเก็บกักเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติก ส่วนการเปลี่ยนแปลงสูงสุดของผิวหนังและขนของหนูในกลุ่มที่ทำตำรับโลชันที่มีอีพิลินหลังจากทาตำรับเป็นเวลา 56 วัน อาจเนื่องจากฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลงในหนูแก่ การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของนีโอโชมชนิดประจุบวกสำหรับเมธิลเอสเทอร์ของกรดไมริสติกในการเพิ่มความคงตัว การนำส่งผ่านเซลล์รูขุมขน และการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในผิวหนังและขนในหนูแก่ ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้รักษาภาวะผมขาวได้