

Thesis Title	Lycopene-loaded Nanostructured Lipid Carriers for Cosmeceutical Applications	
Author	Miss Pornthida Rianganapatee	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Thesis Advisory Committee		
	Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Co-advisor
	Prof. Dr. Rainer H. Müller	Co-advisor
	Prof. Dr. Cornelia M. Keck	Co-advisor

ABSTRACT

Lycopene shows the powerful antioxidant activity and rapidly reacts with singlet oxygen, and free radicals. However, due to its structure which contains many conjugated double bonds, it is easily degraded by oxidation and isomerization. Nanostructured lipid carriers (NLC) have gained high interest as enhancing stability of many active substances from environmental stress. The aims of this study are to develop and characterize lycopene-loaded NLC and to evaluate lycopene-loaded NLC for cosmeceutical applications. The highest lycopene solubility values in melted solid lipids and liquid lipids were 12.0 mg/g and 4.2 mg/mL from orange wax and rice bran oil, respectively. Lycopene melts at 171.03°C and shows crystalline nature under wide angle X-ray scattering (WAXS). The TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and IC₅₀ value of lycopene is 2646.2±3.8 µM/mg and 0.078±0.001 mg/mL,

respectively. All typical sharp peaks were disappeared under WAXS resulting from the degradation of lycopene when exposed to light and oxygen.

Different type of solid lipids which demonstrated the smallest particle size was obtained from the formulation by using orange wax. The production parameters were optimized. Three cycles at 500 bar was chosen to reach a balance between the efficacy and economy of the homogenization process. The study of contact angle on the particle size demonstrated the smaller contact angle gave the smaller particle size which resulting from the high capacity in decreasing interfacial free energy between the two immiscible lipid and aqueous phases during emulsion forming process. Moreover, the smaller particle size obtained is corresponding to the small molecular size of the surfactant. The chemical stability of lycopene entrapped in the NLC was significantly enhanced. The different oil yielded the NLC with different property. Formulation using rice bran oil yields the smaller particle size when compared with other oils. In comparison of NLC and nanoemulsion (NE) with lycopene and without lycopene, the particle size of all 4 formulas remained lower than 250 nm with a relatively narrow size distribution. Entrapment efficiencies were 97.63% and 67.85% for lycopene-loaded NLC and NE, respectively indicated the potent utilization of NLC to increase the stability of lycopene. From the *in vitro* antioxidant activities; ABTS and DPPH assay, the lycopene-loaded NLC had superior potential antioxidant activity to the lycopene-loaded NE. The effect of surfactant on NLC stability showed that the electrostatic stabilizer caused by EumulginTM SG gave the highest stability of over 1 year. Therefore, EumulginTM SG was selected as a promising surfactant to provide long term stability for NLC production.

The preparations and the characterizations of the NLC were explored in comparison with NE and solid lipid nanoparticle (SLN). Particle size expressed as LD (0.99) for the SLN, the NLC without cholesterol, and the NLC with cholesterol were 405 nm, 350 nm, and 287 nm, respectively. Rice bran oil and cholesterol rendered the formation of smaller particles, but cholesterol also reduced the stability in the NLC preparation. To preserve the chemical stability of lycopene in the NLC, cholesterol should be avoided and the storage should be at 4°C or at room temperature (25°C). By using the DSC, NE revealed no observed on melting temperature, enthalpy, and crystallinity index (CI%). Preparing the systems of SLN and NLC, the CI values after 1 day's storage at room temperature (25°C) were 15.60 and 0.11%, respectively. The electron diffraction (ED) pattern from TEM revealed the internal structure of NE is an amorphous form, whereas, SLN and NLC organize as polycrystalline structures.

At the highest lycopene concentration (0.050%), the relatively small particle size of NLC was obtained, providing the evidence that lycopene nanocarrier is a soft material. The *in vitro* release studies demonstrated the biphasic release pattern which revealed a fast release at the initial stage and followed by a prolonged release. The *in vitro* occlusion test found that the occlusion factor increased by the increasing amount of lycopene incorporation. From the *in vitro* antioxidant activities, the 0.050% lycopene-loaded NLC formulation exhibited the highest antioxidant activity corresponding to the amount of lycopene incorporation. The degradation profile of lycopene was extremely retarded when incorporated in NLC and stored at 4°C.

In evaluation of topical dosage form, the occlusion properties of cream containing NLC dispersions yielded a higher occlusion effect than base creams resulting from the advantage of film formation of lipid nanoparticle. The good

chemical stability of lycopene was obtained after incorporating lycopene-loaded NLC into the base cream formulations. The *in vitro* antioxidant tests provided the evidences that incorporation of lycopene-loaded NLC dispersion into the base creams were significantly improved the antioxidant capacities.

It can be concluded that the lycopene-loaded NLC was potentially developed. The chemical stability of lycopene entrapped in the NLC was drastically enhanced. This study emphasized the success on the utilization of NLC to retard the degradation profile of lycopene. Lycopene-loaded NLC and its cosmeceutical formulations provided efficacy occlusive and efficacious in anti-oxidative properties.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ไขมันตัวพาโครงสร้างนาโนกักเก็บไลโคปีนเพื่อการ	
	ประยุกต์ใช้ทางเวชสำอาง	
ผู้เขียน	นางสาว พรธิดา เรียงจนะพาธิ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ศิริพร โอโกโนกิ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ.ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเสวต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	Prof. Dr. Rainer H. Müller	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	Prof. Dr. Cornelia M. Keck	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไลโคปีนแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพและทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอะตอมเดี่ยวและอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามเนื่องจากโครงสร้างที่มีคอนจูเกตของพันธะคู่หลายตำแหน่ง ส่งผลให้มันสลายตัวโดยออกซิเดชันและไฮโดรไลซิสได้อย่างง่ายดาย ไขมันตัวพาโครงสร้างนาโน (เอ็นแอลซี) ได้รับความนิยมสูงในการใช้เพื่อเพิ่มความเสถียรของสารออกฤทธิ์หลายชนิด จากสถานะเครียดจากสิ่งแวดล้อมมุ่งหมายของการศึกษารุ่นนี้เพื่อพัฒนาและตรวจสอบคุณลักษณะของเอ็นแอลซีที่กักเก็บไลโคปีนและประเมินเอ็นแอลซีกักเก็บไลโคปีนเพื่อการประยุกต์ใช้ทางเวชสำอาง ค่าการละลายสูงสุดของไลโคปีนในไขมันแข็งและไขมันเหลวที่ 12.0 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 4.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาจากไขมันและน้ำมันรำข้าวต้มลำดับไลโคปีนหลอดหลอดที่อุณหภูมิ 171.03 องศาเซลเซียส และบ่งชี้ถึงความเป็นผลึกภายใต้รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ ค่า TEAC และค่า IC_{50} ของไลโคปีนคือ $2,646.2 \pm 3.8$ ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมและ 0.078 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับไลโคปีนสลายตัวเมื่อสัมผัสกับแสงและออกซิเจนจึงไม่ปรากฏฟิสิกเฉพาะของไลโคปีนในรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์

ในการศึกษาชนิดของไขมันพบว่าขนาดของอนุภาคนาโนไขมันแข็งที่เตรียมจากไขมันให้ อนุภาคนาโนขนาดเล็กกว่าไขมันอื่นอย่างมีนัยสำคัญ พารามิเตอร์ที่ใช้ในการผลิตที่ดีที่สุดคือการผ่าน กระบวนการสามรอบที่ความดัน 500 บาร์เพื่อให้สมดุลระหว่างประสิทธิภาพและต้นทุนในการผลิต ในการศึกษาผลของมุมสัมผัสกับขนาดอนุภาคของเอ็นแอลซีพบว่ามุมสัมผัสขนาดเล็กให้เอ็นแอลซี ที่มีขนาดเล็กเนื่องจากความสามารถในการลดพลังงานอิสระที่พื้นผิวระหว่างพื้นผิวไขมันกับน้ำที่ไม่เข้ากันในระหว่างกระบวนการก่ออิมัลชัน นอกจากนี้ ขนาดอนุภาคที่เล็กยังมีความสอดคล้อง สัมพันธ์กับขนาดของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวที่เล็กเสถียรภาพทางเคมีของไลโคปีนที่กักเก็บใน เอ็นแอลซีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในการศึกษาผลของน้ำมันพบว่าน้ำมันรำข้าวให้อนุภาคนาโน เล็กที่สุด ในการเปรียบเทียบเอ็นแอลซีกับนาโนอิมัลชันที่กักเก็บไลโคปีนและไม่กักเก็บไลโคปีน พบว่าขนาดอนุภาคของทั้ง 4 ตัวรับยังคงต่ำกว่า 250 นาโนเมตรและมีการกระจายขนาดค่อนข้าง แคบหลังจากการผลิต ประสิทธิภาพในการกักเก็บไลโคปีนของเอ็นแอลซีและนาโนอิมัลชันเป็น 97.63 เปอร์เซ็นต์ และ 67.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับจากการทดสอบโดยวิธี ABTS และ DPPH เอ็น แอลซีกักเก็บไลโคปีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพเหนือกว่าไลโคปีนที่กักเก็บด้วยนาโน อิมัลชัน สารลดแรงตึงผิวยูมัลจิน เอสจี รักษาความคงสภาพของสูตรมากกว่า 1 ปี ดังนั้น ยูมัลจิน เอสจี จึงถูกเลือกให้เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีแนวโน้มดีที่สุดเพื่อให้ระบบเอ็นแอลซีมีเสถียรภาพใน ระยะยาว

ในการพัฒนาเอ็นแอลซีกักเก็บไลโคปีนคุณสมบัติของเอ็นแอลซีถูกเปรียบเทียบกับนาโน อิมัลชันแบบดั้งเดิมและอนุภาคนาโนไขมันแข็งในรุ่นแรกนั้นคือเอสแอลเอ็น พบว่าระบบเอสแอล เอ็น, เอ็นแอลซีที่ไม่มีและมียอเลสเตอรอลมีอนุภาคน้อยกว่า 405, 350, 287 นาโนเมตรตามลำดับ น้ำมันรำข้าวและคอเลสเตอรอลช่วยลดขนาดของอนุภาค แต่คอเลสเตอรอลยังลดเสถียรภาพของ ระบบเอ็นแอลซี เพื่อเพิ่มความคงตัวทางเคมีของไลโคปีนในระบบเอ็นแอลซีควรหลีกเลี่ยง คอเลสเตอรอลและควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยใช้ดีเอสซี นาโนอิมัลชันไม่แสดงจุดหลอมเหลว ค่าการเปลี่ยนแปลงพลังงานและเปอร์เซ็นต์ค่า ความเป็นผลึก ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ค่าความเป็นผลึกของเอสแอลเอ็นและเอ็นแอลซีหลังจากเก็บไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีค่า 15.60 และ 0.11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รูปแบบการเลี้ยวเบนของ

อิเล็กทรอนิกส์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านผยถึงโครงสร้างภายในของนาโนอีมีลชันเป็นรูปแบบอสัณฐานในขณะที่เอ็สแอลเอ็นและเอ็นแอลซีจัดเรียงเป็นแบบพหุผลึก

ขนาดอนุภาคของเอ็นแอลซีที่มีไลโคปีนความเข้มข้นสูงที่สุด (ร้อยละ 0.050) ยังคงค่อนข้างเล็กซึ่งแสดงหลักฐานว่าระบบตัวพานาโนนำส่งไลโคปีนเป็นวัสดุที่อ่อน การศึกษาการปลดปล่อยยาในหลอดทดลองพบว่า การปลดปล่อยเป็นแบบ 2 ระยะซึ่งเผยให้เห็นถึงการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในระยะเริ่มต้นและตามมาด้วยการปลดปล่อยแบบเนิ่นช้า การทดสอบคุณสมบัติเคลือบคลุมในหลอดทดลองพบว่าการเคลือบคลุมดียิ่งขึ้นเมือความเข้มข้นของไลโคปีนเพิ่มขึ้น จากการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ ด้านออกซิเดชันโดยหลอดทดลองพบว่า เอ็นแอลซีกักเก็บไลโคปีนเข้มข้นร้อยละ 0.050 มีค่าฤทธิ์ ด้านออกซิเดชันที่สูงที่สุดซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณไลโคปีนที่กักเก็บการสลายตัวของไลโคปีนลดลงอย่างมากเมื่อถูกกักเก็บไว้ในเอ็นแอลซีแลงกับไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในการประเมินรูปแบบยาใช้ทางผิวหนัง คุณสมบัติการเคลือบคลุมของครีมที่มีส่วนผสมเอ็นแอลซีนี้นสูงกว่าครีมฐานซึ่งเป็นผลประโยชน์อันเนื่องมาจากการเกิดแผ่นฟิล์มของอนุภาคนาโนไขมัน ไลโคปีนมีเสถียรภาพทางเคมีที่ดีเมื่อผสมเอ็นแอลซีกักเก็บไลโคปีนลงในครีมฐาน การทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันในหลอดทดลองได้แสดงหลักฐานว่าการผสมไขมันตัวพาโครงสร้างนาโนกักเก็บไลโคปีนลงในครีมฐานสามารถเพิ่มความสามารถในฤทธิ์ด้านออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าไขมันตัวพาโครงสร้างนาโนกักเก็บไลโคปีนได้ถูกวิจัยพัฒนาขึ้นอย่างมีศักยภาพความเสถียรภาพทางเคมีของไลโคปีนเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากเมื่อไลโคปีนถูกกักเก็บในระบบไขมันตัวพาโครงสร้างนาโน ในงานวิจัยนี้ต่อกัย ความสำเร็จในการใช้ประโยชน์จากไขมันตัวพาโครงสร้างนาโนเพื่อการชะลอการสลายตัวของไลโคปีน ไขมันตัวพาโครงสร้างนาโนกักเก็บไลโคปีนและสูตรตำรับทางเวชสำอางของไขมันตัวพาโครงสร้างนาโนกักเก็บไลโคปีนแสดงผลเพื่อการประยุกต์ใช้ทางเวชสำอางอย่างมีประสิทธิภาพตามที่ต้องการ