

**Thesis Title** Development of Nanodelivery System of Thai Medicinal Plant Oils via Microemulsion

**Author** Mr. Kiattisak Saeio

**Degree** Doctor of Philosophy (Pharmacy)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi Advisor

Asst. Prof. Dr. Songwut Yotsawimonwat Co-advisor

Dr. Suganya Tachakittirungrod Co-advisor

**ABSTRACT**

The aim of this research thesis study was to develop the nanodelivery system of the oils from Thai medicinal plants that have antityrosinase or antioxidant activity. The development of nanodelivery system of the oils was done by microemulsion technique. According to this development, the factors influencing microemulsion formation, physicochemical and stability of microemulsions were investigated. The reason of microemulsion development is that microemulsion has many advantages such as spontaneous formation, thermodynamic stability, improved drug solubilization and bioavailability, and ease of manufacturing and scale-up. In this research, twenty nine oils from Thai medicinal plants were evaluated for their antioxidant and tyrosinase inhibition activities. The results from antioxidant test by ferric reducing antioxidant power (FRAP) method found that *O.gratisimum* Linn. oil

gave the highest activity with equivalent concentration (EC) value of 3.743mM/mg. The results from ABTS free radical scavenging assay expressed as trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) value of this oil was 1.059mM/mg. Tyrosinase inhibition activity test was done for searching of oil possessed the skin whitening action. It was found that *H. cordata* Thunb. oil showed the highest tyrosinase inhibition value of 74.86% followed closely by the oil of *C. citratus* Stapf. (lemongrass) with the inhibition values of 73.89%. *C. citratus* Stapf. oil was selected for further study on phase diagram construction due to its high yield value and its high antityrosinase activity with some antioxidant activity. *S. indicum* Linn. (sesame) oil was selected as representative of fixed oil in this comparative experiment.

Pseudoternary phase diagrams of lemongrass oil and sesame oil were constructed to investigate the microemulsion area by using titration method. For each phase diagram, the weight ratios of the oil and the surfactant system were varied and titrated with water. The surfactants used in this study were of non-ionic type such as Tween 20, Tween 85, Brij 97 and Triton X114. Six straight alcohols (ethanol, n-propanol, n-butanol, n-pentanol, n-hexanol and n-octanol) were used as co-surfactants. The surfactant system was composed of one surfactant and one co-surfactant. The effect of ratio of surfactant to cosurfactant was investigated. The results could be concluded that Tween 20 was suitable for lemongrass oil whereas Tween 85 gave the highest microemulsion area for sesame oil. Ethanol showed the best co-surfactant for both lemongrass oil and sesame oil with the ratio of surfactant to ethanol of 2:1.

Sodium chloride and calcium chloride with concentrations of 0.1, 0.5 and 1 M were added into the aqueous phase of this experiment to study the effect of ionic

strength and concentration of electrolytes. The results found that both types of electrolyte had no significant effect on microemulsion area. The effect of pH was studied in the range pH of 4.0 - 8.0. The results revealed that pH 4.0 - 6.0 did not affect the area of the microemulsions of lemongrass oil and sesame oil. However, the microemulsion areas of both oils were decreased at pH 8.0.

The suitable microemulsion base formulas were selected from the pseudoternary phase diagrams of each oil. Clotrimazole was loaded to the selected microemulsion bases to a concentration of 1%. All selected microemulsions showed the conductivity higher than 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  indicating that they were o/w type microemulsions. The microemulsions of lemongrass oil could be prepared with or without cosurfactant, while sesame oil microemulsion formation needed cosurfactant. The droplet size of lemongrass oil microemulsion base ranged from 24.54 to 52.64 nm which was smaller than sesame oil microemulsion base which possessed the size range of 74.58 to 76.38 nm. It was found that the droplet size of microemulsions loaded with clotrimazole was bigger than that of the microemulsion base.

The release profile of clotrimazole microemulsion was done at 37°C for 10 hr using 50% ethanol as a dissolution medium. The result showed that the release of drug loaded in the lemongrass oil microemulsions was faster than that loaded in the sesame oil microemulsions. This was considered to be due to smaller droplet size of the lemongrass oil microemulsion.

Stability test of the microemulsions was done for a period of 5 months kept in 4°C, 30°C (room temperature) and 45°C. The results revealed that the physical property of microemulsion bases of lemongrass oil was stable as same as the drug loaded microemulsions. No physical change such as phase separation or precipitation

was observed. However, some drug chemical change was revealed. Clotrimazole loaded in the microemulsions was decomposed at 45°C. The kinetic decomposition of drug was proposed to be the first-order kinetic. More than 80% of drug still remained in the microemulsions kept at 4°C and 30°C. Therefore, the microemulsions showed high stability when kept at room temperature or in the refrigerator. Sesame oil microemulsion showed same stability as lemongrass oil microemulsion. However, the sesame oil microemulsion expressed more intense yellow.

In conclusion, microemulsions of lemongrass oil and sesame oil were the suitable nano-vehicles for clotrimazole due to their high stability, small size and good appearance. The lemongrass oil microemulsion formulations composed of 10/33/17/40 of oil, Tween 20, ethanol, water and the sesame oil microemulsion composed of 10/40/20/30 of oil, Tween 85, ethanol, water were the best formulations that should be further developed as the drug nanodelivery for clinical use. Both were different in quantity of surfactant systems the sesame oil microemulsion required a higher amount of surfactant than lemongrass oil microemulsion.

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์**      การพัฒนาระบบนำส่งนาโนโดยอาศัยไมโครอิมัลชันของน้ำมันพืช  
สมุนไพรรไทย

**ผู้เขียน**      นายเกียรติศักดิ์ แซ่อิว

**ปริญญา**      วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

รศ.ดร.ศิริพร โอโกโนกิ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ.ดร.ทรงวุฒิ ขยิมลวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร.สุกัญญา เตชกิตติรุ่งโรจน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์นี้ จัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาระบบนำส่งนาโนจากน้ำมันที่ได้จากพืชสมุนไพรรไทยที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหรือต้านอนุมูลอิสระ เป็นการพัฒนากระบวนการนำส่งยาแบบนาโนโดยใช้เทคนิคไมโครอิมัลชัน ในการพัฒนาตำรับ มีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชัน การศึกษาลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ และความคงตัวของไมโครอิมัลชัน ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพสูง มีข้อดีคือสามารถเตรียมได้ง่าย โดยระบบสามารถเกิดขึ้นได้เองไม่ต้องใช้พลังงานจำนวนมาก มีความเสถียรทางอุณหพลศาสตร์ สามารถเพิ่มการละลายของตัวยาและค่าชีวสมมูลในร่างกาย รวมทั้งสามารถที่จะทำการผลิตและนำไปใช้ทางอุตสาหกรรมได้ง่าย ในการวิจัยนี้ได้มีการสกัดตัวอย่างน้ำมันจากพืชสมุนไพรรไทยจำนวน 29 ตัวอย่าง นำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนส การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระพบว่าน้ำมันยี่หว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ผลการทดสอบโดยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ได้ค่า EC เท่ากับ 3.7430 มิลลิโมลต่อมิลลิกรัม และโดยวิธี ABTS free scavenging assay ได้ค่า TEAC เท่ากับ 1.059 มิลลิโมลต่อมิลลิกรัม ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนสที่ทำให้เกิดผิวขาว พบว่าน้ำมันพลูคาวให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์สูงสุดโดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 74.86 และตามติดมาด้วยน้ำมันตะไคร้ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 73.89 น้ำมันตะไคร้ถูกเลือกมาใช้ในการทดลอง



ขั้นตอนต่อไปเพื่อสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมเนื่องจากสามารถสกัดได้ในปริมาณมากเพื่อสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมเนื่องจากสามารถสกัดได้ในปริมาณมาก และมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี รวมทั้งยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระบ้าง ส่วนน้ำมันงาใช้เป็นตัวแทนของน้ำมันระเหยยากที่นำมาทดลองเปรียบเทียบ

แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมของน้ำมันตะไคร้และน้ำมันงาได้ถูกสร้างขึ้นโดยวิธีไคเตรตเพื่อใช้ศึกษาหาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารที่ทำให้เกิดบริเวณไมโครอิมัลชัน แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมแต่ละชนิด ได้มาจากการใช้น้ำมันต่อระบบสารลดแรงตึงผิวในสัดส่วนต่าง ๆ โดยน้ำหนัก มาทำการไคเตรตด้วยน้ำ สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดไม่มีประจุได้แก่ Tween 20, Tween 85, Brij 97 และ Triton X114 และสารช่วยของสารลดแรงตึงผิวได้แก่ แอลกอฮอล์ชนิดสายตรง 6 ชนิด ได้แก่ เอทานอล, โพรพานอล, บิวทานอล, เพนทานอล, เฮกซานอล และ อ็อกทานอล ระบบสารลดแรงตึงผิวหมายถึงส่วนผสมที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว 1 ชนิด และสารช่วยของสารลดแรงตึงผิว 1 ชนิด ได้ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนต่าง ๆ ระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารช่วยของสารลดแรงตึงผิว ผลการทดลองโดยสรุปพบว่า Tween 20 เหมาะสมที่จะใช้กับน้ำมันตะไคร้ และ Tween 85 เหมาะสมที่จะใช้กับน้ำมันงา เนื่องจากให้พื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันสูงที่สุด และพบว่าเอทานอลเป็นสารช่วยของสารลดแรงตึงผิวที่ดีที่สุด โดยใช้อัตราส่วนระบบสารลดแรงตึงผิวที่ผสมกับสารช่วยของสารลดแรงตึงผิว เท่ากับ 2:1

เกลือโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 โมลาร์ ถูกนำมาทดสอบผลกระทบของความแรงของไอออนิกและความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งพบว่าไม่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชัน ส่วนในการทดสอบความเป็นกรดด่างที่ค่าพีเอช 4, 6 ไม่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชัน แต่พบว่าที่ค่าพีเอช 8 พื้นที่ของไมโครอิมัลชันมีแนวโน้มลดลง

คาร์บอนไมโครอิมัลชันพื้นที่เหมาะสมถูกเลือกมาจากแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมของน้ำมันแต่ละชนิด และตัวยาโครโทมาโซลถูกนำมาบรรจุลงในไมโครอิมัลชันพื้นที่คัดเลือกให้มีความเข้มข้นของตัวยา 1 เปอร์เซ็นต์ ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ทั้งหมด มีค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่า 50 ไมโครซีเมนต์ต่อเซนติเมตร แสดงว่าเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้สามารถเกิดได้จากระบบสารลดแรงตึงผิวที่มีและไม่มีสารช่วยของสารลดแรงตึงผิว ในขณะที่น้ำมันงา จะเกิดไมโครอิมัลชันได้ก็ต่อเมื่อในระบบสารลดแรงตึงผิวมีสารช่วยของสารลดแรงตึงผิวด้วยเท่านั้น ขนาดของวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันพื้นที่ของน้ำมันตะไคร้มีค่าอยู่ในช่วง 24.54 ถึง 52.64 นาโนเมตร ซึ่งเล็กกว่าขนาดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันพื้นที่ของน้ำมันงาซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 74.58 ถึง 76.38 นาโนเมตร พบว่าบรรจุตัวยาโครโทมาโซลเข้าไปมีผลทำให้ขนาดของวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันเพิ่มขึ้น

การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาโคลไทรมาโซลจากไมโครอิมัลชัน ทำโดย ใช้ตัวกลางคือ เอธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าตัวยาสามารถปลดปล่อยออกมาจากไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้ได้เร็วกว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันงา ซึ่งมาจากการที่ขนาดของอนุภาคภายในของไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้มีขนาดเล็กกว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันงา

การศึกษาความคงสภาพของตำรับ โดยเก็บไมโครอิมัลชันที่อุณหภูมิ 4, 30 (อุณหภูมิห้อง) และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าไมโครอิมัลชันพื้นของน้ำมันตะไคร้มีความคงตัว เช่นเดียวกับไมโครอิมัลชันที่ผสมด้วยกล่าวคือไม่เกิดการแยกชั้น ไม่เกิดการตกตะกอน หรือการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ทางกายภาพ แต่พบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวยาตัวยาโคลไทรมาโซล สลายตัวสูงสุดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยเป็นการสลายตัวแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง สำหรับไมโครอิมัลชันที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ตัวยายังคงเหลือในตำรับมากกว่าร้อยละ 80 นั้นแสดงถึงความสามารถในการเก็บไมโครอิมัลชันได้ทั้งในอุณหภูมิห้องและในตู้เย็น กรณีของไมโครอิมัลชันของน้ำมันงาพบว่ามีความคงตัวเช่นเดียวกับไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้ แต่สีของไมโครอิมัลชันมีความเข้มมากกว่า

การทดลองนี้สรุปได้ว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้และน้ำมันงาเหมาะสมในการใช้เป็นตัวนำส่งยาเนื่องจากมีความเสถียร มีอนุภาคภายในขนาดเล็ก และมีลักษณะภายนอกที่สวยงาม ไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้ที่มีอัตราส่วนระหว่างน้ำมัน ทวิน 85 เอธานอล และน้ำ ที่ 10/33/17/40 และไมโครอิมัลชันของน้ำมันงาที่มีอัตราส่วนระหว่าง น้ำมัน ทวิน 20 เอธานอล และน้ำที่ 10/40/20/30 เป็นอัตราส่วนที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาแบบนาโนเพื่อใช้ทางคลินิกต่อไป ซึ่งไมโครอิมัลชันของน้ำมันงาต้องการปริมาณของระบบสารลดแรงตึงผิวที่มากกว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้