

<b>Thesis Title</b>	The Entrapment of Bioactive Compounds from Rice Bran Oil Production in Nanovesicles for Cosmetic Uses	
<b>Author</b>	Ms. Romchat Chutoprapat	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Prof. Dr. Aranya Manosroi	Chairperson
	Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Member
	Prof. Dr. Masahiko Abe	Member
	Assoc. Prof. Dr. Phuriwat Leesawat	Member

### ABSTRACT

The objective of this study was to entrap the bioactive compounds including ferulic acid (F),  $\gamma$ -oryzanol (O) and phytic acid (P) from wastes of rice bran oil production in Thailand in nanovesicles for cosmetic uses. The semi-purified extracts containing F, O and P were prepared from acid distilled oil, crude oil and rice bran with the highest contents of  $0.289 \pm 0.002$ ,  $14.41 \pm 0.69$  and  $10.47 \pm 0.28$  mg/g, respectively. The blank niosomes composed of Tween 61 mixed with cholesterol at 1:1 molar ratio which gave the highest physical stability at  $4 \pm 2$ ,  $30 \pm 2$  and  $45 \pm 2$  °C for 3 months were selected to entrap the semi-purified rice bran extracts containing F, O, P and their combination (Mixed FOP) at the maximum loading of 0.5, 1.5, 1.5 and 3.5 %w/w of niosomal forming materials, respectively prepared by chloroform film with sonication (CFS) and supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) technique. The niosomes entrapped and not entrapped with the semi-purified rice bran extracts prepared by both CFS and scCO<sub>2</sub> were physical stable with the size of 300-1500 nm. The morphology of niosomes prepared by CFS and scCO<sub>2</sub> were in the mixture of unilamellar and multilamellar vesicles (MLVs) and large unilamellar vesicles (LUVs), respectively. The phase transition temperature (T<sub>c</sub>) of all niosomes prepared by both methods was in the range of 75 to 81 °C with the  $\Delta H$  of +0.337 to +0.661 kJ/mol. The LUV niosomes by scCO<sub>2</sub> gave higher entrapment efficiencies of the hydrophilic bioactive compounds, F ( $64.47 \pm 1.17\%$ ) and P ( $54.85 \pm 0.11\%$ ) and lower entrapment efficiencies of the hydrophobic bioactive compound, O ( $47.54 \pm 2.31\%$ ) than niosomes by CFS which were at  $53.56 \pm 1.76$  (F),  $60.79 \pm 0.65$  (P) and  $53.48 \pm 0.15$  (O)%, respectively. The three antioxidative activities including DPPH radical

scavenging, metal chelating and inhibition of lipid peroxidation of niosomes entrapped with the semi-purified rice bran extracts were lower than the unentrapped extracts due to the high stability of the extracts in the niosomes. The chemical stability of F, O and P in the semi-purified rice bran extracts, the entrapped niosomes, gel and cream incorporated with the entrapped niosomes kept at  $4 \pm 2$ ,  $30 \pm 2$  and  $45 \pm 2$  °C for 12 weeks was investigated. The contents of F, O and P in the unentrapped extracts were less than those entrapped in niosomes, and in gel and cream formulations. In *in vitro* rat skin permeation studies by vertical Franz diffusion cells at 6 hrs, F and P from Nio FOP gave lower fluxes in viable epidermis and dermis (VED) than those from Mixed FOP of 1.09 and 1.62 times, respectively, while O from Nio FOP gave higher fluxes in VED than those from Mixed FOP of 2.39 times. The highest fluxes in VED of F, O and P were from Gel nio, Cream nio and Mixed FOP at  $0.261 \pm 0.009$ ,  $2.662 \pm 0.045$  and  $4.309 \pm 0$  ng/(cm<sup>2</sup>hr), respectively. The irritation studies on shaved rabbit skin of the extracts containing F, O, P, Mixed FOP, the entrapped niosomes, gel and cream incorporated with the entrapped niosomes investigated by the Draize method gave no signs of erythema or edema detected within 72 hrs. Gel and cream containing the rice bran extracts entrapped in niosomes showed higher antioxidant capacity than the gel and cream base formulations in ORAC assay and also gave higher inhibition of lipid peroxidation activity than no treatment. Moreover, gel and cream containing the rice bran extracts entrapped in niosomes demonstrated hydration enhancement ability and improvement of pigmentation, thickness, roughness and elasticity in the skin of human volunteers. Therefore, gel and cream containing the semi-purified rice bran extracts containing the bioactive compounds entrapped in niosomes can be applied as a novel skin product against skin aging due to not only the enhancement of the chemical stability of the bioactive compounds and the potential of niosomes in facilitating the absorption through rat skin of F and O while retarding the permeation of P by entrapping in niosomes, but also the superior antioxidative activities and the *in vivo* skin moisturizing effects of human volunteers as well.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การเก็บกักสารสำคัญจากการผลิตน้ำมันรำข้าวในถุง  
ขนาดนาโนเพื่อใช้ทางเครื่องสำอาง

ผู้เขียน นางสาวรมย์ฉัตร ชูโตพัฒน์

ปริญญา วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต

(เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย

ประธานกรรมการ

ศ. ดร. จิระเดช มโนสร้อย

กรรมการ

ศ. ดร. มาชาฮีโกะ อาเบะ

กรรมการ

รศ. ดร. ภูริวัฒน์ ลีสวัสดิ์

กรรมการ

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บกักสารสำคัญ ferulic acid (F),  $\gamma$ -oryzanol (O) และ phytic acid (P) จากของเหลือของการผลิตน้ำมันรำข้าวในประเทศไทยในถุงขนาดนาโนเพื่อใช้ทางเครื่องสำอาง ได้เตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ F, O และ P จาก acid distilled oil, crude oil และ rice bran ที่มีปริมาณสูงสุดของ F O และ P คือ  $0.289 \pm 0.002$   $14.41 \pm 0.69$  และ  $10.47 \pm 0.28$  มิลลิกรัม ต่อกรัมตามลำดับ นีโอโซมเปล่าที่ประกอบด้วยทวิน 61 ผสมกับคอเลสเตอรอลในอัตราส่วนโมลาร์ 1:1 มีความคงตัวทางกายภาพสูงสุดที่  $4 \pm 2$   $30 \pm 2$  และ  $45 \pm 2$  °ซ เป็นเวลานาน 3 เดือน ได้คัดเลือกนีโอโซมนี้เพื่อเก็บกักสารสกัดรำข้าวกึ่งบริสุทธิ์ F O P และสารสกัดผสมของ F O และ P (Mixed FOP) ซึ่งสามารถเก็บกักในปริมาณสูงสุด คือ 0.5 1.5 1.5 และ 3.5% โดยน้ำหนักขององค์ประกอบนีโอโซมตามลำดับ ซึ่งเตรียมโดยวิธี chloroform film with sonication (CFS) และเทคนิคซูเปอร์คริติคัลฟลูอิด (scCO<sub>2</sub>) นีโอโซมที่เก็บกักและไม่เก็บกักสารสกัดรำข้าวกึ่งบริสุทธิ์โดยวิธี CFS and scCO<sub>2</sub> มีความคงตัวทางกายภาพและมีขนาดอนุภาค 300-1500 นาโนเมตร นีโอโซมที่เตรียมโดย CFS และ scCO<sub>2</sub> เป็นอนุภาคผนังสองชั้นชั้นเดียวร่วมหลายชั้นและอนุภาคผนังสองชั้นชั้นเดียวขนาดใหญ่ตามลำดับ อุณหภูมิทรานซิชัน (Tc) ของนีโอโซมทั้งหมดที่เตรียมโดยทั้งสองวิธี

อยู่ในช่วง 75 ถึง 81 °ซ และมีค่าเอนทัลปี ( $\Delta H$ ) ในช่วง +0.337 ถึง +0.661 กิโลจูลต่อโมล นิโอโซมผนังสองชั้นชั้นเดียวขนาดใหญ่ที่เตรียมโดย  $\text{scCO}_2$  ให้ประสิทธิภาพการเก็บกักสารสกัดที่ละลายน้ำ F ( $64.47 \pm 1.17\%$ ) และ P ( $54.85 \pm 0.11\%$ ) สูงกว่าสารสกัดที่ละลายในน้ำมัน O ( $47.54 \pm 2.31\%$ ) แต่น้อยกว่านิโอโซมที่เตรียมโดยวิธี CFS ซึ่งเก็บกักได้  $53.56 \pm 1.76$  (F)  $60.79 \pm 0.65$  (P) และ  $53.48 \pm 0.15$  (O)% ตามลำดับ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging metal chelating และ inhibition of lipid peroxidation) ของนิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดรำข้าวถึงบริสุทธิ์มีค่าน้อยกว่าสารสกัดที่ไม่ได้เก็บกักในนิโอโซม เนื่องจากสารสกัดไม่ถูกปลดปล่อยและมีความคงตัวสูงในนิโอโซม ในการศึกษาความคงตัวทางเคมีของ F O และ P ที่มีในสารสกัดรำข้าวถึงบริสุทธิ์ นิโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เจลและครีมที่ประกอบด้วยนิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดเมื่อเก็บไว้ที่  $4 \pm 2$   $30 \pm 2$  และ  $45 \pm 2$  °ซ นาน 12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณ F O และ P ในสารสกัดที่ไม่ได้เก็บกักในนิโอโซมต่ำกว่าสารสกัดที่เก็บกักในนิโอโซมและในสูตรครีมและเจล ในการศึกษาการซึมผ่านหนังหนูโดย vertical Franz diffusion cells ที่ 6 ชั่วโมง พบว่า F และ P จาก Nio FOP ให้ค่า flux ในชั้นผิวหนัง (VED) ต่ำกว่า Mixed FOP 1.09 และ 1.62 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ O จาก Nio FOP ให้ค่า flux ในชั้นผิวหนัง (VED) สูงกว่า Mixed FOP 2.39 เท่า ทั้งนี้ค่า flux สูงสุดในชั้นผิวหนังของ F O และ P พบใน Gel nio Cream nio และ Mixed FOP ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $0.261 \pm 0.009$   $2.662 \pm 0.045$  and  $4.309 \pm 0$   $\text{ng}/(\text{cm}^2\text{hr})$  ตามลำดับ ในการศึกษาการระคายเคืองผิวในกระต่ายด้วยวิธี Draize ของสารสกัด F O P Mixed FOP นิโอโซมเก็บกักสารสกัด เจลและครีมที่ประกอบด้วยนิโอโซมเก็บกักสารสกัด ไม่พบการระคายเคืองภายใน 72 ชั่วโมง เจลและครีมที่ประกอบด้วยสารสกัดรำข้าวเก็บกักในนิโอโซมให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเจลและครีมเบสใน ORAC assay และให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation สูงกว่าเมื่อไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้เจลและครีมที่ประกอบด้วยสารสกัดรำข้าวที่เก็บกักในนิโอโซมแสดงประสิทธิภาพในการเพิ่มความชุ่มชื้น ทำให้สีผิวขาวขึ้นและช่วยปรับลักษณะความหนา ริ้วรอยและความยืดหยุ่นผิวในอาสาสมัครคน ดังนั้น เจลและครีมที่ประกอบด้วยสารสกัดรำข้าวถึงบริสุทธิ์ที่เก็บกักในนิโอโซมสามารถประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่เพื่อต้านริ้วรอยสำหรับผิวหนัง โดยไม่เพียงช่วยเพิ่มความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญ นิโอโซมยังมีศักยภาพช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของ F และ O ขณะที่ชะลอการซึมผ่านผิวของ P อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีผลเพิ่มความชุ่มชื้นผิวหนังในอาสาสมัครคนที่ศึกษาด้วย