

Thesis Title The Entrapment of Kojic Acid and Its Derivative in Bilayer Vesicles for Cosmetic Uses

Author Ms. Paveena Wongtrakul

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Aranya	Manosroi	Chairperson
Prof. Dr. Masahiko	Abe	Member
Assoc. Prof. Dr. Jiradej	Manosroi	Member

ABSTRACT

The objective of this study was to develop the bilayer vesicle formulations, which can entrap both hydrophilic and hydrophobic substances. The formulations were evaluated by vesicle formation, entrapment efficiency, irritation, transdermal absorption and stability. Kojic acid was employed as a hydrophilic substance and kojic oleate was synthesized as a representation of hydrophobic substance in order to increase entrapment efficiency in the vesicles. The N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) / 4-(N,N-dimethylamino) pyridine (DMAP) esterification method was used to synthesize kojic oleate from kojic acid and oleic acid. The synthesized product was identified by FAB-MS, ¹H NMR and IR. The bilayer vesicles were prepared by the conventional chloroform film method with mixtures of amphiphile (non-ionic surfactants and phospholipids), cholesterol and dicetyl phosphate at 9.5:9.5:1.0 molar ratio. The amounts of kojic acid or kojic oleate entrapped in the vesicles were analyzed by HPLC. Kojic acid and kojic oleate associated with the vesicles were then incorporated in Carbopol 980 gel base. The *in vitro* transdermal absorption through the excised rat skin of kojic acid or kojic oleate entrapped in the vesicles was studied. Additionally, irritation in rabbits and performance test of the vesicular formulations in volunteers were also performed. The synthesized product was identified as kojic monoester (kojic oleate), which had the melting point at 34.6°C. Kojic acid and kojic oleate could be successfully encapsulated in the bilayer vesicles (Span 60, Tween 61 and DPPC vesicles). The entrapment efficiency of kojic acid in the aqueous compartment of the bilayer vesicles was about

0.01 to 0.04 mole per mole of amphiphile/cholesterol/dicetyl phosphate, whereas kojic oleate gave higher entrapment efficiency of about 0.25 to 0.35 mole per mole of amphiphile/cholesterol/dicetyl phosphate. Kojic oleate was expected to be embedded in the hydrophobic domains of the vesicles. However, Tween 61 and DPPC vesicles could entrap higher amount of kojic acid and kojic oleate than Span 60 vesicles did. These vesicular formulations both with and without kojic acid or kojic oleate showed no irritation on rabbit skin.

The bilayer structure was still intact in gel formulations investigated by TEM. The *in vitro* transdermal absorption study through the excised rat skin showed that the vesicles enhanced penetration of kojic acid but retarded penetration of kojic oleate. The vesicular formulations showed a 5.73- and 1.88-fold higher penetration of kojic acid in the receiving solution for Tween 61 and DPPC vesicles, respectively, as compared to kojic acid in aqueous solution. However, in the stratum corneum and the deeper skin layer (viable epidermis and dermis), kojic acid in aqueous solution gave higher deposition of 1.20-, 1.89- and 1.21-, 2.07-fold comparing to kojic acid entrapped in Tween 61 and DPPC vesicles, respectively. Meanwhile, the vesicular formulations of Tween 61 and DPPC demonstrated 3.74-, 9.07-fold lower deposition of kojic oleate in stratum corneum and 17.06-, 6.26-fold lower in viable epidermis dermis as compared to kojic oleate in 2% Tween 20 solution. The fluxes of kojic oleate obtained from Tween 61 and DPPC vesicles were also lower than that in Tween 20 solution. The enhancement effect could also be detected from the vesicles incorporated in gel formulations. Kojic acid in Tween 61 and DPPC vesicles incorporated in gel formulations exhibited 1.76-, 1.57-fold higher deposition of kojic acid in the stratum corneum, 1.97-, 1.20- fold in viable epidermis and dermis and 2.45-, 1.96-fold in the receiving solution comparing to kojic acid gel, respectively. The incorporation of kojic oleate entrapped in Tween 61 and DPPC vesicles in gel also delayed the absorption for 1.0-, 5.82-fold lower deposition in stratum corneum and 1.59-, 5.61-fold lower in viable epidermis and dermis than those of kojic oleate gel, respectively. The performance study in volunteers by Mexameter[®] showed that the vesicular formulations had superior skin whitening activity over the non-vesicular formulations. Additionally, no irritation in rabbits was observed from the studied formulations. Therefore, the bilayer vesicles prepared from non-ionic surfactants and phospholipids can be a delivery system of both hydrophilic and hydrophobic substances for transdermal application. This formulation is potentially an effective cosmetic preparation.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเก็บกักกรดโคจิกและอนุพันธ์ในอนุภาคผนังสองชั้นเพื่อใช้ทางเครื่อง
 ล่าออง

ผู้เขียน นางสาวปวีณา ว่องตระกูล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย

ประธานกรรมการ

Prof. Dr. Masahiko Abe

กรรมการ

รศ. ดร. จีระเชษฐ มโนสร้อย

กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับอนุภาคผนังสองชั้นที่สามารถเก็บกักทั้งสารที่ละลาย
 ในน้ำและสารที่ละลายในน้ำมันโดยประเมินผลจากการเกิดของอนุภาค ความสามารถในการเก็บกัก
 สาร ความระคายเคือง การซึมผ่านผิวหนังและความคงตัว ได้ใช้กรดโคจิกเป็นตัวแทนของสาร
 ละลายในน้ำ และได้สังเคราะห์โคจิกโพลิเอทจากกรดโคจิกและกรดโพลิอิกโดยใช้โคซัยโคเฮกซิล
 คาร์โบไดอิมด์ (DCC) / ไดมethylอะมิโนไพรีดีน (DMAP) เพื่อใช้เป็นตัวแทนของสารละลายใน
 น้ำมัน และได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วย FAB-MS, ¹H NMR และ IR ได้เตรียม
 อนุภาคผนังสองชั้นโดยวิธีคลอโรฟอร์มฟิล์มจากสารผสมของแอมฟิฟาย (สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่
 มีประจุและฟอสโฟลิปิด) คลอเลสเตอรอลและโคเซตติลฟอสเฟตที่อัตราส่วนโมลาร์ 9.5 : 9.5 : 1.0
 ได้วิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกและโคจิกโพลิเอทในอนุภาคผนังสองชั้นโดยเครื่องโครมาโตกราฟี
 ของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) จากนั้นได้นำกรดโคจิกและโคจิกโพลิเอทที่เก็บกักในอนุภาค
 ผนังสองชั้นผสมลงในเจลพีนคาร์โบพอล 980 และได้ทำการทดลองการซึมผ่านของกรดโคจิกและ
 โคจิกโพลิเอทที่ถูกเก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นผ่านหนังหนู รวมทั้งการทดสอบการก่อระคาย
 เคืองในกระต่ายและการศึกษาประสิทธิภาพของตำรับอนุภาคผนังสองชั้นกับอาสาสมัคร พบว่าสาร
 สังเคราะห์ที่เตรียมได้เป็นโคจิกโมโนเอสเทอร์ (โคจิกโพลิเอท) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ 34.6 องศา
 เซนติเกรด กรดโคจิกและโคจิกโพลิเอทสามารถถูกเก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากสเปน
 60 ทวิน 61 และดีพีพีซี โดยกรดโคจิกถูกเก็บกักในชั้นน้ำของอนุภาคผนังสองชั้นได้ประมาณ 0.01

ถึง 0.04 โมลต่อโมลของแอมฟิฟาย/คลอเลสเทอรอล/โคเลสเตอรอล/โคเลสเตอรอล/โคเลสเตอรอล/โคเลสเตอรอล ในขณะที่โคจิกโกลิเอทถูกเก็บกักในส่วนละลายในน้ำมันของอนุภาคผนังสองชั้นได้ 0.25 ถึง 0.35 โมลต่อโมลของแอมฟิฟาย/คลอเลสเทอรอล/โคเลสเตอรอล/โคเลสเตอรอล โดยที่อนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากทวิน 61 และดีพีพีซีให้เปอร์เซ็นต์การเก็บกักกรดโคจิกและโคจิกโกลิเอทในปริมาณที่สูงกว่าอนุภาคสองชั้นที่เตรียมจากสแปน 60 นอกจากนี้ตัวรับที่เตรียมได้ทั้งที่ประกอบด้วยและปราศจากกรดโคจิกและโคจิกโกลิเอทไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย

กรดโคจิกและโคจิกโกลิเอทที่เก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นยังคงสภาพในเจลพื้นคาร์โบพอล 980 ในการศึกษาการซึมผ่านหนังหนูพบว่าอนุภาคผนังสองชั้นช่วยเพิ่มการซึมผ่านหนังหนูของกรดโคจิกแต่กลับลดการซึมผ่านหนังหนูของโคจิกโกลิเอท อนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากทวิน 61 และดีพีพีซีเพิ่มการซึมผ่านหนังหนูของกรดโคจิกเป็น 5.73- และ 1.88- เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับสารละลายกรดโคจิก อย่างไรก็ตาม การสะสมของกรดโคจิกในชั้นสตราตัมคอร์เนียมและหนังหนุชั้นที่ลึกกว่า (ชั้นหนังกำพร้าที่ยังมีชีวิตและชั้นหนังแท้) ของสารละลายกรดโคจิกมีค่ามากกว่า โดยคิดเป็น 1.20-, 1.89- และ 1.21-, 2.07- เท่าของกรดโคจิกที่เก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากทวิน 61 และดีพีพีซีตามลำดับ ในขณะที่ตัวรับอนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากทวิน 61 และดีพีพีซีมีการสะสมของโคจิกโกลิเอทน้อยกว่าเป็น 3.74- และ 9.07- เท่าในหนังหนุชั้นสตราตัมคอร์เนียม และ 17.06-, 6.26- เท่าในผิวหนังชั้นที่ลึกกว่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับโคจิกโกลิเอทในสารละลาย 20% ของทวินอีลีบ นอกจากนี้อัตราการซึมผ่านหนังหนูของโคจิกโกลิเอทที่เก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากทวิน 61 และดีพีพีซีน้อยกว่าโคจิกโกลิเอทในสารละลาย 20% ของทวินอีลีบ กรดโคจิกเก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นที่อยู่ในตัวรับเจลถูกดูดซึมเพิ่มมากขึ้น โดยอนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากทวิน 61 และดีพีพีซีช่วยเพิ่มการสะสมของกรดโคจิกเป็น 1.76-, 1.57- เท่าในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม และ 1.97-, 1.20- เท่าในหนังหนุชั้นที่ลึกกว่า และมากกว่าเป็น 2.45-, 1.96- เท่าในสารละลายตัวรับตามลำดับเมื่อเทียบกับกรดโคจิกในเจล การผสมโคจิกโกลิเอทเก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากทวิน 61 และดีพีพีซีลงในตัวรับเจลช่วยชะลอการดูดซึมผ่านหนังหนูของโคจิกโกลิเอทลดลงเป็น 1.00-, 5.82- เท่าในหนังหนุชั้นสตราตัมคอร์เนียม และ 1.59-, 5.61- เท่าในหนังหนุชั้นที่ลึกกว่าตามลำดับ จากการศึกษาประสิทธิภาพการทำให้ผิวหนังในอาสาสมัครโดยใช้เครื่องแมกซามิเตอร์แสดงให้เห็นว่าตัวรับเจลที่มีกรดโคจิกและโคจิกโกลิเอทเก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้นผสมอยู่ทำให้ผิวหนังกว่าตัวรับเจลของกรดโคจิกและโคจิกโกลิเอทที่ไม่ได้เก็บกักในอนุภาคผนังสองชั้น นอกจากนี้ทุกตัวรับที่ทำการศึกษายังไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ดังนั้นตัวรับที่ประกอบด้วยอนุภาคผนังสองชั้นที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิด

ไม่มีประจุและฟอสฟอรีลสามารถนำมาใช้เป็นระบบนำส่งสารผ่านผิวหนังได้ทั้งสารที่ละลายในน้ำและสารที่ละลายในน้ำมัน คำรับดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved