โครงการย่อยที่ 2

โครงการ การศึกษาการเตรียมและความคงตัวของสารสกัดมะขามป้อม เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ยา อาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอาง

(Study on preparation and stability of *Phyllantus embellica* extract for drug health food and cosmetic)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรัศมิ์ ปิ่นสุวรรณ

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC3) และเซลล์ปอด (MRC5) พร้อมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในตำรับ วิธีการศึกษาทำโดยการนำผลมะขามป้อมมาสกัดด้วยน้ำและเอทานอลตามวิธีการสกัดที่หมอพื้นบ้านใช้ในการเตรียมยาเพื่อรักษาผู้ป่วย ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging และ lipid peroxidation in liposome ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี sulphorhodamine B (SRB) และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคโดยวิธี Folin-Ciocalteu สารสกัดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดจะนำมาแยกสารสำคัญเพื่อใช้เป็น marker ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ จากการทดลองพบว่าเนื้อมะขามป้อมชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.85 µg/ml สารสกัดเนื้อมะขามป้อมชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมสูงสุด (IC_{50}= 29.863 µg/ml) เนื้อมะขามป้อมชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.14 µg/ โดยสารสกัดทั้งหมดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อย (IC_{50} > 50 µg/ml)

จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของสารสกัดชั้นเอทานอลของเนื้อมะขามป้อมซึ่งเป็นพืชที่เป็นส่วนประกอบของตรีผลาและที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด นำมาแยกสารบริสุทธิ์ ได้ 4 ชนิดคือ ß-sitosterol (C2) ß-sitosterol-3-*O*-ß-D-glucopyranoside (C3) 5-hydroxymethylfurfural (C4) และ gallic acid (C5) เมื่อมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ปากมดลูก ต่อมลูกหมาก และเซลล์ปกติ พบว่า gallic acid มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.21 µg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ปากมดลูก ต่อมลูกหมาก และเซลล์ปกติ โดยมีค่า IC_{50} = 40.75, 69.12, 51.41 และมากกว่า 100 µg/ml ตามลำดับ ß-sitosterol, ß-sitosterol-3-*O*-ß-D-glucopyranoside และ 5-hydroxymethylfurfural ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (EC_{50} > 100 µg/ml) และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ปากมดลูก และเซลล์ปกติ (IC_{50} > 100 µg/ml)

สารสกัดมะขามป้อมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.22 µg/ml และมี total phenolic contents 427.8 mg/g พบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะสัมพันธ์กับปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัด (R^2 = 0.9762) สารสกัดมะขามป้อมมีความคงตัวดีทั้งที่อุณหภูมิห้องและ 45°C ในระยะเวลา 240 วัน นอกจากนี้เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย สารสกัดจะมีความคงตัวดีที่ pH 5.5 (skin pH) ทั้งในแง่ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolic compounds ซึ่งแสดงให้ศักยภาพในการนำสารสกัดไปพัฒนาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารสกัดมีสภาพความเป็นกรดค่อนข้างสูงจึงอาจมีผลต่อการระคายเคืองต่อผิวหนังและการดูดซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนัง ในการวิจัยนี้จึงได้พัฒนาสารกัดในรูปแบบไลโปโซมซึ่งนอกจากจะช่วยในการดูดซึมของสารสกัด การเก็บกักสารไว้ภายในไล

โปโซมจะช่วยให้สารสกัดมีความคงตัวมากขึ้นและลดการระคายเคืองต่อผิวหนัง นอกจากนี้ไลโปโซมเองยังช่วยให้สภาพผิวหนังมีความชุ่มชื้นมากขึ้น

จากการเตรียมไลโปโซม พบว่า สามารถเตรียมไลโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมได้โดยวิธี modified ethanol injection ซึ่งส่วนประกอบของผนังไลโปโซมที่เหมาะสม คือ SPC : TWEEN 80 : DA โดยไลโปโซมที่ได้มีลักษณะเป็นคอลลอยด์สีเหลืองอ่อน มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 334.8 ± 34.06 nm และมีประสิทธิภาพการเก็บกักสาร (Entrapment efficiency) ประมาณ 68.44 ± 3.09 % พบว่า ไลโปโซมมะขามป้อมที่เตรียมได้ มีความคงตัวดีทั้งลักษณะทางกายภาพ, ขนาดอนุภาค และ %entrapment เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 80 วัน ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 8-10°C) และเมื่อทำการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังพบว่าไลโปโซมมะขามป้อม สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดมะขามป้อมที่ความเข้มข้นเดียวกัน เมื่อนำไลโปโซมสารสกัดมะขามป้อมมาทดลองเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางพบว่าไลโปโซมมะขามป้อมสามารถนำมาเตรียมเป็นสาระสำคัญเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องสำอางได้หลายชนิด เช่น ครีม โลชัน และลิปสติก เป็นต้น

Abstract

The objectives of this study were to determine antioxidant activity and total phenolic contents and to evaluate cytotoxic activity against three types of human cancer cell lines; the human breast adenocarcinoma cell lines (MCF-7), the human cervical cancer cell lines (Hela) and prostate cancer (PC3) cell lines and one type of normal human cell line, lung cells (MRC-5). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging assay was used to test free radical scavenging activity and liposome assay was used to test lipid peroxidation. Folin-Ciocalteu's assay was used to determine the total phenolic contents and Sulphorhodamine B (SRB) assay was used to test cytotoxic activity against all types of cells. The two extract procedures used water and ethanolic extraction were similar to those practiced by Thai traditional doctors. The pure compounds were isolated from the plant with the best activities. The results found that the ethanolic extract of *P. emblica* had the highest antioxidant activity in DPPH assay with an EC_{50} value of 2.85 μg/ml. The water extract of the pulp of *P. emblica* showed the highest cytotoxic activity against Hela cancer cell lines (IC_{50} = 30.14 μg/ml).

Bioassay guided fractionation was used for isolation of the pulp *Phyllanthus emblica* Linn, which showed the highest activity. Four pure compounds were found including ß-sitosterol (C2), ß-sitosterol-3-*O*-ß-D-glucopyranoside (C3), 5-hydroxymethylfurfural (C4) and gallic acid (C5). These compounds were tested for antioxidant and cytotoxic activities. Among them, gallic acid was the only compound that exhibited an antioxidant activity (EC_{50} = 0.21 μg/ml) but had no cytotoxicity against all types of cancer cell lines (IC_{50} = 40.75, 69.12 and 51.41 μg/ml of MCF-7, Hela and PC3, respectively) and normal cell line (IC_{50} > 100 μg/ml). ß-sitosterol, ß-sitosterol-3-*O*-ß-D-glucopyranoside and 5-hydroxymethylfurfural exhibited no antioxidant activity (EC_{50} > 100 μg/ml) and no cytotoxicity against all types of cell lines (IC_{50} > 100 μg/ml).

The antioxidant activity of *P. emblica* extract was evaluated and it was shown that EC_{50} was 3.22 μg/ml and total phenolic contents was 427.8 mg/g. This result reveals evidence that the high amounts of total phenolic contents found in the extract were correlated with the best antioxidant activity (R^2= 0.9762). The antioxidant activity, an amount of phenolics contents and

extract stability of *P. emblica,* were found to remain after the extract was exposed to the condition of 45°C for 240 days. The *P. emblica* extract also maintained stability within pH 5.5 aqueous solution. The *P. emblica* extract was the target for herbal product development including cosmetic products. However, the acidity and high polarity of gallic acid might irritate the skin and limit skin absorption. Further analyses were focused on liposome-containing *P. emblica* extract to solve these problems.

The *P. emblica* liposome preparation was performed using the modified ethanol injection method. The formulation of liposome which consisted of SPC: Tween 80: DA gave better colloidal with pale yellow appearances and average particle size at 334.8 ± 34.06 nm. The entrapment efficiency of liposome was approximately 68.44 ± 3.09%. These compositions, activities and physical characteristics of *P. emblica* liposome remained after being exposed to the condition of 8-10°C for 80 days. Skin permeation assay was evaluated and results indicated that liposome-containing *P. emblica* extract had better skin absorption than extract alone.

In conclusion, the study results indicated that *P. emblica* liposome exhibits an active ingredient that shows a potential as an antioxidant compound and can be considered in cosmetic product development i.e. cream, lotion and lipstick.