

**FORMULATION AND EVALUATION OF FACIAL PATCH
CONTAINING *PHYLLANTHUS EMBLICA* EXTRACT
NANOLIPOSOMES**

Mr. Nattapong Pholpaiboondeeying

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmaceutical Technology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University**



4 8 7 6 8 5 5 7 3 3

การตั้งสูตรตำรับและประเมินแผ่นแปะผิวหน้าที่ประกอบด้วยนาโนลิพโซมของสารสกัด
ผสมมะขามป้อม

นาย ณัฐพงษ์ ผลไพบูลย์ดียิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

512052

Thesis Title FORMULATION AND EVALUATION OF FACIAL
PATCH CONTAINING *PHYLLANTHUS EMBLICA*
EXTRACT NANOLIPOSOMES
By Mr. Nattapong Pholpaiboondeeying
Field of Study Pharmaceutical Technology
Thesis Principal Advisor Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University
in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... *Pornpen Pramyothin* Dean of the Faculty of
Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... *Papavadee Klongpityapong* Chairman
(Associate Professor Papavadee Klongpityapong)

..... *Ubonthip Nimmannit* Thesis Principal Advisor
(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

..... *Nontima V.* Member
(Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

..... *Warangkana Warisnoicharoen* Member
(Assistant Professor Warangkana Warisnoicharoen, Ph.D.)

..... *Panassaya Suppasansatorn* Member
(Panassaya Suppasansatorn, Ph.D.)

ฉันทัพย์ ผล โพนุลย์คียิ่ง : การตั้งสูตรตำรับและประเมินแผ่นแปะผิวหนังที่ประกอบด้วย
นาโนลิโปโซมของสารสกัดผสมมะขามป้อม (FORMULATION AND EVALUATION
OF FACIAL PATCH CONTAINING *PHYLLANTHUS EMBLICA* EXTRACT
NANOLIPOSOMES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. อุบลทิพย์ นิยมานนิตย์,
131 หน้า.

มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) เป็นพืชในตระกูล Euphorbiaceae มีการใช้ในการ
รักษาเป็นครั้งแรกในประเทศอินเดีย เนื่องจาก มะขามป้อมมีประโยชน์มากมายมีฤทธิ์ทางชีววิทยา
ได้แก่ ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ และ
ป้องกันการเหี่ยวมาจากรังสีที่ทำให้เกิดการทำลายของโครโมโซมที่เกิดจากรังสี ในงานวิจัยนี้ ได้มี
การพัฒนาสูตรตำรับนาโนลิโปโซม ที่มีเปอร์เซ็นต์การกักเก็บสารสกัดมะขามป้อมสูงสุด โดย
พัฒนาจากวิธีเอธานอลอินเจกชัน และ ไลปิดเอ็กซ์ทรูชัน เปอร์เซ็นต์การกักเก็บสารสูงสุดที่ได้ คือ
50.56% จากการเตรียมนาโนลิโปโซมที่มีส่วนประกอบของผนังเมมเบรน เป็น ฟอสฟาติดีลโคลีน
จากถั่วเหลือง และ Tween® 80 ในอัตราส่วน 5:1 มีส่วนผสมของสารสกัดมะขามป้อมในอัตรา
ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย คือ 566.67 ± 43.50 นาโนเมตร จากนั้นได้
พัฒนาแผ่นแปะผิวหนังที่มีส่วนประกอบของสารสกัดมะขามป้อมนาโนลิโปโซมในอัตราร้อยละ 1
โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั้นหลังของแผ่นแปะผิวหนังประกอบด้วย พอลิไวนิลแอลกอฮอล์อัตรา
ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสารก่อกฟิล์ม อีกทั้งยังเป็นส่วนผสมในชั้นติดผิว และใช้
กลีเซอรินอัตราร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็น พลาสติไซเซอร์ แผ่นแปะผิวหนังที่มี
ส่วนประกอบของสารสกัดมะขามป้อมนาโนลิโปโซมร้อยละ 1 ให้ค่าความต้านแรงดึง 40.30 ± 4.32
MPa เปอร์เซ็นต์การยืด 37.32 ± 5.31 ค่ายังส์โมดูลัส 246.10 ± 12.21 MPa แรงที่ฟิล์มขาด 2.13 ± 2.30
MJ และมีลักษณะเป็นแผ่นบางใสที่น่าพอใจ สารสกัดมะขามป้อมมีการปลดปล่อยจากนาโนลิโปโซม
ในแผ่นแปะผิวหนังในอัตรามากกว่าร้อยละ 99 ภายใน 6 ชั่วโมง การทดสอบประสิทธิภาพในการ
เพิ่มความชุ่มชื้นของน้ำที่ผิวและเพิ่มความยืดหยุ่นของผิวในอาสาสมัครจำนวน 21 คน บริเวณ
หน้าผากโดยใช้เครื่อง Skin Diagnostic SD 27 และ DermaLab® Elasticity probe และการถ่ายภาพ
พบว่า ความชุ่มชื้นของน้ำที่ผิวเพิ่มขึ้น และ ค่ายังส์โมดูลัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) มีผล
ทำให้คุณสมบัติการยืดหยุ่นของผิวเพิ่มขึ้นหลังจากใช้ ผลิตภัณฑ์ 4 สัปดาห์

สาขาวิชา เทคโนโลยีเภสัชกรรม

ปีการศึกษา.....2551.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....


##4876855733: MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

KEY WORD: *PHYLLANTHUS EMBLICA* / LIPOSOMES / FACIAL PATCH

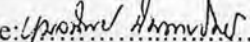
NATTAPONG PHOLPAIBOONDEEYING: FORMULATION AND EVALUATION OF
FACIAL PATCH CONTAINING *PHYLLANTHUS EMBLICA* EXTRACT
NANOLIPOSOMES. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. UBONTHIP
NIMMANNIT, Ph.D., 131 pp.

Phyllanthus emblica L. (*P. emblica*) was known as *mak-kham-pom* in Thailand and it was in Euphorbiaceae family. Firstly, it has been used as the medicinal plant in India because it has many benefits in biological effects including anti-oxidant activity, anti-tyrosinase activity, anti-microbial activity and protection against radiation-induced chromosome damage. In this study, different ratios of soybean phosphatidylcholine (SPC) to Tween®80 of liposomal membrane were formulated and the best formula that gives the highest percent encapsulation efficiency of *P. emblica* extract was selected to be an active ingredient for preparing the facial patch. The highest percent encapsulation efficiency was 50.56% obtained from nanoliposome formulation in the ratio of 5:1 SPC: Tween®80 containing 1% w/v of *P. emblica* extract with the mean particle sizes of 566.67 ± 43.50 nm. The facial patch containing *P. emblica* extract nanoliposomes was developed. The backing layer of the facial patch composed of 2.5% w/v PVA as a film forming agent and the plasticizer was 1% w/v glycerin. The active ingredient was 1% *P. emblica* extract nanoliposomes. This facial patch provided the most satisfactory mechanical properties of 40.30 ± 4.32 MPa tensile strength, $37.32 \pm 5.31\%$ elongation, 246.10 ± 12.21 MPa Young's modulus, and 2.13 ± 2.3 MJ work of failure, the physical appearance of thin film was transparent. In the diffusion study, more than 99% *P. emblica* extract was released from nanoliposomes in facial patch within 6 hours. Clinical tests of moisturizing and elasticity were performed in 21 volunteers using Skin Diagnostic SD 27 and DermaLab® Elasticity probe instrument to measure moisture content and elasticity on the forehead area. The moisture contents were increased and Young's modulus were significantly decreased ($p < 0.05$) resulted in the improvement of elasticity of the skin after 4 weeks of application. Macroscopic photograph was also taken to evaluate and corresponded to these results.

Field of Study: Pharmaceutical Technology

Student's Signature: 

Academic Year: 2008

Principal Advisor Signature: 

ACKNOWLEDGEMENTS

I am deeply indebted to many people who gave their kind contributions to my study. First of all, I would like to express my profound gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Ubonthip Nimmannit, for her valuable comments and suggestions, her kindness and constant encouragement throughout my study. I am very much obliged to the members of my thesis committee for their scrutiny and discussion.

Moreover, I am most grateful for the depth reviews that precede the completion of this thesis.

I would like to thank Mr. Boonlaer Ngotrawornchai, Miss. Siripen Vethchagarun and Miss. Kaew Kajornchaiyakul of the Scientific and Technological Research Equipment Center of Chulalongkorn University for the useful suggestion and data of TEM and particle size analysis to my thesis.

I also would like to thank Ms. Naree Choosrichom and Ms. Nusara Chomanee department of pathology Siriraj Hospital for the useful suggestion and data of TEM.

I would like to express appreciate to Miss. Pornpen Kongaimpatee, Miss. Sumalee Wannachaiyasit, Miss. Apirada Sucontphunt and Miss. Saranya Uk-karawittayapumi for the useful suggestion and helping me in anyway during the time of my study.

I also would like to express appreciate to all the faculty members in the Pharmaceutical Technology (International) Program for their help and encouragement.

Above all, my deep appreciation goes to my friends and other people, whose names have not been mentioned, for helping me in anyway during the time of my study.

Finally, I would like to express my sincerest and deepest gratitude to my family for their love, care, understanding and support.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEW.....	5
1. Skin.....	5
2. Rational approach to drug delivery to and via the skin.....	16
3. <i>Phyllanthus emblica</i>	17
4. Tannin.....	26
5. Gallic acid.....	27
6. Nanoparticles.....	28
7. Liposomes.....	29
8. Transdermal Therapeutic Systems.....	41
9. <i>In vitro</i> drug release study.....	50
10. <i>In vivo</i> efficacy tests on human volunteers.....	56
III. MATERIALS AND METHODS.....	58
1. Preparation of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	60
2. Physical Characterization of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	61
2.1 Particle size determination.....	61
2.2 Morphology.....	62

2.3 Determination of encapsulation efficiency.....	62
3. Preparation of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	64
3.1 Determination of the amount of plasticizers.....	64
3.2 Preparation of backing layer of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	64
3.3 Determination of the amount for casting.....	64
3.4 Preparation of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	65
4. Physical evaluation of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	65
4.1 Appearance of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	65
4.2 Mechanical properties of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	65
5. Determination of <i>P. emblica</i> extract.....	67
5.1 HPLC Analysis.....	67
5.2 The calibration curve of gallic acid using HPLC.....	67
5.3 Validation of HPLC method.....	68
5.4 Quantitative analysis of gallic acid using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)...	70
6. <i>In vitro</i> diffusion study of <i>P. emblica</i> extract from nanoliposomes from the facial patch.....	70
7. <i>In vivo</i> skin moisturizing and elasticity efficacy test of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes..	71
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	72
1. Preparation of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	72
2. Physical Characterization of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	73

2.1 Determination of particle size and size distribution	73
2.2 Transmission electron microscope	73
2.3 Determination of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes encapsulation efficiency	76
3. Preparation of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes	79
3.1 Determination of the amount of plasticizers	79
3.2 Preparation of backing layer of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes	80
3.3 Determination of the amount of aqueous solution for casting	81
3.4 Preparation of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes	81
4. Physical evaluation of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes	82
5. Determination of <i>P. emblica</i> extract	83
5.1 Quantitative analysis of gallic acid using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	83
6. <i>In vitro</i> diffusion study of <i>P. emblica</i> extract from nanoliposomes from the facial patch	84
7. <i>In vivo</i> skin moisturizing and elasticity efficacy test of facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes	87
V. CONCLUSIONS	96
REFERENCES	98
APPENDICES	106
APPENDIX I	107
APPENDIX II	112
APPENDIX III	121
VITA	131

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	The classes of chemical constituents reported in <i>Phyllanthus emblica</i>	21
2	Reported biological effects of <i>P. emblica</i>	25
3	Qualitative description of polymer and its stress-strain characteristics.....	48
4	Formulation of <i>P. emblica</i> extract in different ratio of liposomal membrane and tween 80.....	60
5	Mean particle size and span of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes in formulation 1-6.....	73
6	% Encapsulation efficiency and % recovery of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes in formulation 1-6.....	77
7	Formulations of facial patch containing different concentration of glycerin.....	80
8	Mechanical property data of film formula 1-5.....	80
9	Mechanical properties data of film no. 6, 7, and 8.....	81
10	Mechanical properties data of film formula no.9.....	82
11	The release profile of the facial patches containing <i>P. emblica</i> extract.....	85
12	The release profile of the facial patches containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	85
13	The results of average skin hydration after using facial patches containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes from week 0, 1, 2, 3, and 4.....	87
14	Estimated marginal means of each group.....	88
15	Pairwise comparison of each group by SPSS program.....	88
16	Average value of skin hydration of each group after using the patches for the last 4 weeks.....	90
17	The Young's modulus of skin on forehead in 21 volunteers.....	91
18	Estimated marginal means of each group.....	92

TABLE	PAGE
19 Pairwise comparison of each group by SPSS program.....	92
20 Average value of Young's modulus of each group after using the patches for the last 4 weeks.....	94
21 Accuracy of gallic acid.....	110
22 Intraday precision of gallic acid.....	112
23 Interday precision of gallic acid.....	113
24 Linearity of gallic acid.....	115
25 Limit of quantification of gallic acid.....	116
26 The statistical data of skin hydration.....	119
27 The statistical data of skin hydration using SPSS program.....	124
28 The statistical data of Young's modulus.....	125
29 The statistical data of Young's modulus using SPSS program.....	130

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1	The basic diagram of skin structure	6
2	The layers of the epidermis	7
3	<i>Phyllanthus emblica</i>	19
4	<i>Phyllanthus emblica</i> (barks and trees)	20
5	Structure of Hydrolyzable Tannins and Condensed Tannins	27
6	Structure of gallic acid	28
7	Structures of SUVs, MLVs and LUVs	31
8	Structure of a number of phospholipids regularly used in liposomes	33
9	The general procedure involves preparation of liposomes, hydration with agitation, and sizing by sonication and extrusion to a homogeneous distribution of vesicles	36
10	The method for preparation liposomes	37
11	Preparation of liposomes by modified ethanol injection	38
12	The positions of drugs which are located in the liposomes	40
13	Release profiles, plotted both linearly and as square route functions of time, for matrix or monolith patches operating under Higuchi condition	45
14	Fundamental construction for suspension type transdermal therapeutic system based on a matrix or monolith design	45
15	Transdermal therapeutic system based on a rate-limiting membrane design	46
16	Release profile from rate-limiting membrane patches; effect of increasing amount of drug partitioned into the membrane and adhesive on storage which provides the 'burst' component	47
17	Mechanical behavior and corresponding stress-strain characteristics of polymers	50
18	The static Franz diffusion cell	51

FIGURE	PAGE	
19	Transmission electron micrographs of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes, presence of multilamellar vesicles (x 450,000).....	74
20	Transmission electron micrographs of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes, presence of multilamellar vesicles (x 180,000).....	75
21	Transmission electron micrographs of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes showed aggregation of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes in range of nanoparticles.....	76
22	% Encapsulation efficiency of <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes.....	77
23	Facial patch containing <i>P. emblica</i> extract nanoliposomes formula no. 9.....	82
24	The HPLC chromatogram of <i>P. emblica</i> extract.....	83
25	Calibration curve of the standard gallic acid.....	84
26	The release of <i>P. emblica</i> extract from facial patch.....	86
27	Average moisture content of each group after using facial patch containing different formula.....	89
28	Graphs of average value of skin hydration of each group after using the facial patches for the last 4 weeks.....	90
29	Average Young's modulus of each group after using facial patch containing different formulas.....	93
30	Graphs of average value of Young's modulus of each group after using the facial patches for the last 4 weeks.....	94
31	The macroscopic photograph of the wrinkle line.....	95
32	<i>P. emblica</i> extract powder from transparent juice.....	108
33	Calibration curve of gallic acid analysis using HPLC method.....	114
34	HPLC chromatogram of gallic acid in citrate-phosphate buffer pH 5.5.....	117

LISTS OF ABBREVIATIONS

°C	=	Degree Celsius
cm	=	centimeter
cm ²	=	square centimeter
CV	=	coefficient of variation
DSPC	≡	distearolylphosphatidylcholine
DTS	=	Dermal therapeutic system
Eqn.	=	equation
et al.	=	et alii, and others
g	=	gram
GAGs	=	glycosaminoglycans
h	=	hour
HPLC	=	high performance liquid chromatography
LUVs	=	large unilamellar vesicles
M	=	mole per liter
mg	=	milligram
μg	=	microgram
min	=	minute
mJ	=	millijoule
mL	=	milliliter
μL	=	microliter
MLVs	=	multilamellar vesicles
mM	=	millimole per liter
MMPs	=	matrix metalloproteinases
MPa	=	millipascal.second
MW	=	molecular weight
μm	=	micrometer
μM	=	micromole per liter
N	=	Newton
nm	=	nanometer
nM	=	nanomole per liter
No.	=	number

PBS	=	phosphate buffered saline
PC	=	phosphatidylcholine
PVA	=	polyvinyl alcohol
R ²	=	coefficient of determination
RH	=	relative humidity
rpm	=	revolution per minute
RSD	=	relative standard deviation
SD	=	standard deviation
sec	=	second
SPC	=	phosphatidylcholine from soybean lecithin
SUVs	=	small unilamellar vesicles
T _c	=	phase transition temperature
TDDS	=	transdermal drug delivery system
TEM	=	transmission electron microscope
TFA	=	trifluoroacetic acid
TTS	=	transdermal therapeutic system
TEWL	=	transepidermal water loss
ULVs	=	unilamellar vesicles
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume