

ผลของชนิดน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมต่อคุณสมบัติทางเคมี
ฟิสิกส์และการซึมผ่านของสารสกัดบัวบกในไมโครอิมัลชัน



ร้อยโทหญิง วราภรณ์ กาบบัวลอย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6371-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF OILS, SURFACTANTS AND COSURFACTANTS ON
PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND PERMEATION OF
CENTELLA ASIATICA EXTRACT IN MICROEMULSIONS

Lieutenant Waraporn Kabbovloi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Pharmacy in Pharmacy

Department of Pharmacy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University


Academic Year 2004

ISBN 974-17-6371-9

วารสารณ์ กาบบัวลอย : ผลของชนิดน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมต่อคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และการซึมผ่านของสารสกัดบัวบกในไมโครอิมัลชัน.(EFFECTS OF OILS, SURFACTANTS AND COSURFACTANTS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND PERMEATION OF *CENTELLA ASIATICA* EXTRACT IN MICROEMULSIONS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุชาดา ชุติมาวรัตน์, 305 หน้า. ISBN 974-17-6371-9.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันที่ผสมสารสำคัญจากบัวบก และประเมินผลของส่วนประกอบในตำรับต่อแผนภาพระบบไตรภาค หรือระบบไตรภาคไม่แท้ รวมทั้งการซึมผ่านเมมเบรนจากหนังงู วัตถุประสงค์น้ำมันที่ใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชันคือ ไอโซโพรพิลไมริสเทต (ไอพีเอ็ม) และคาโปรลิก/คาปริลไตรกลีเซอไรด์ และสารลดแรงตึงผิวที่ศึกษาได้แก่ บริดจ์ 30, บริดจ์ 97, อะลาโทนที และทวิน 80 ร่วมกับสแปน 80 ในสัดส่วน 1:1 และ 2:1 การเตรียมไมโครอิมัลชันระบบไตรภาคไม่แท้ใช้โพรเพน-2-ออล และโพรพิลีนไกลคอลเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ระบบไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วยไอพีเอ็ม เป็นน้ำมัน และ บริดจ์ 30 ร่วมกับโพรเพน 2 ออล หรือ บริดจ์ 97 ร่วมกับโพรเพน-2-ออล ในอัตราส่วน 2:1 ให้พื้นที่ส่วนไขมันแผนภูมิมากที่สุดคือ 36.11% ได้คัดเลือกตำรับไมโครอิมัลชัน 15 ตำรับ ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของไมโครอิมัลชัน ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้า ความหนืด พีเอช ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบโพลาไรซ์ และขนาดอนุภาค จากตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดบัวบก 15 ตำรับเมื่อนำมาศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารสำคัญจากบัวบกด้วยฟรานซ์ดีฟิวชันเซลล์ โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ เอเชติโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และ กรดเอเชติค โดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิวิด โครมาโตกราฟีระบบเกรเดียนท์ พบว่า ตำรับไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วยไอพีเอ็ม ทวิน 80 สแปน 80 โพรเพน-2-ออล และ น้ำ ในสัดส่วน 30: 20: 10 : 30 : 10 ให้ผลการซึมผ่านผิวหนังสูงที่สุด เมื่อศึกษาความคงตัวโดยสภาวะเค้นโดยการใส่การสลับไปมาระหว่างภาวะร้อนและเย็น โดยพิจารณาจากปริมาณสารเอเชติโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชติค พบว่า ไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดบัวบกดังกล่าวมีความคงตัวดี

ภาควิชา เกษษกรรม
สาขาวิชา เกษษกรรม
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต.....วารสารณ์ กาบบัวลอย.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

##4576598133 MAJOR: PHARMACY

KEYWORD: *CENTELLA ASIATICA*/ MICROEMULSION/ PERMEATION/
PHYSIOCHEMICAL PROPERTIES/ ASIATICOSIDE

WARAPORN KABBOVLOI : EFFECTS OF OILS, SURFACTANTS AND
COSURFACTANTS ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND
PERMEATION OF *CENTELLA ASIATICA* EXTRACT IN
MICROEMULSIONS. THESIS ADVISOR : ASSSOC. PROF. SUCHADA
CHUTIMAWORAPAN, Ph.D., 305 pp. ISBN 974-17-6371-9.

The purposes of the study were to develop the preparation of *Centella asiatica* microemulsions and investigate the effects of composition of microemulsions on the pseudoternary phase diagram and permeation through shed snake skin membrane. The microemulsions were prepared using either isopropyl myristate (IPM) or caprylic/capric triglyceride as oil phase and various surfactants, including Brij 30, Brij 97, Arlatone T, and mixture of Tween 80 and Span 80 of 1 : 1 and 2 : 1 ratios. Propan-2-ol and propylene glycol were employed as cosurfactants to design microemulsions by constructing pseudoternary phase diagrams. The microemulsion system containing IPM as oil, Brij 30 : propan-2-ol and Brij 97: propan-2-ol at the ratio of 2:1 presented the highest percentage of isotropic area at 36.11. The physicochemical properties of microemulsion were evaluated such as conductivity, viscosity, pH, optical property under polarized light microscopy and droplet size. Selected fifteen formulations of microemulsion containing Centella triterpene extract with different surfactants and cosurfactants were prepared and evaluated. The permeation profiles of microemulsions containing Centella triterpene extract were explored using Franz diffusion cells and the samples were analyzed for asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid by high-performance liquid chromatography with gradient system. It was found that the microemulsion comprised of isopropyl myristate: Tween 80: Span 80: propan-2-ol: water as 30: 20: 10: 30: 10, showed the highest permeation rate. Additionally, the microemulsions containing Centella extract showed a good stability, regarding asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid under the stress condition of heating-cooling cycle.

Department Pharmacy

Field of study Pharmacy

Academic year 2004

Student's signature.....Waraporn Kabbovloi..

Advisor's signature.....Suchada Chutimaworan

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my profound gratitude to my advisor, Associate Professor Suchada Chutimaworapan, Ph.D. for her meaningful advice, guidance, encouragement throughout my research study.

I wish to express appreciation to Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Ph.D. and Assistant Professor Rutt Suttisri, Ph.D. for their kind assistance and invaluable consultation about the *Centella asiatica* extraction and I appreciate to Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D. for his advice about the analysis.

I wish to express appreciation to Associate Professor Porntip Nimmannitya, M.Sc., Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D. and Assistant Professor Panida Vayumhasuwan, Ph.D. as members of the thesis committee for their suggestions and comments.

Special thanks are given to The East Asiatic (Thailand) Public Company Limited for their supplying Brij 30, Brij 97 and Arlatone T and the Graduate School, Chulalongkorn University for granting partial financial support to my thesis work.

My acknowledgements are expressed to the Government for partial financial support to this project.

I wish to thank friends for their friendship, staffs of the Department of Pharmacy and other people whose names have not mentioned for their assistance and great helpful support. Also, the special thanks are given to the Royal Thai Army Medical Department for their permission of my study.

Ultimately, I would like to express my thanks my family for their endless love, understanding, encouragement and cheerfulness throughout this study.

CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEW.....	4
III. MATERIALS AND METHODS.....	32
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	54
V. CONCLUSIONS.....	104
REFERENCES.....	106
APPENDICES.....	107
VITA.....	305

LIST OF TABLES

Table	Page
1	Compositions of oil and surfactant in microemulsion..... 43
2	Compositions of surfactant and cosurfactant in microemulsion with caprylic/capric triglyceride as oil and propan-2-ol as cosurfactant..... 43
3	Compositions of surfactant and cosurfactant in microemulsion with caprylic/capric triglyceride as oil and propylene glycol as cosurfactant... 44
4	Compositions of surfactant and cosurfactant in microemulsion with isopropyl myristate as oil and propan-2-ol as cosurfactant..... 44
5	Compositions of surfactant and cosurfactant in microemulsion with isopropyl myristate as oil and propylene glycol as cosurfactant..... 45
6	Microemulsion formulas for permeation study of effect of oil and surfactant..... 46
7	Microemulsion formulas for permeation study of effect of cosurfactant... 52
8	Data for standard curve of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in methanol..... 63
9	Data for standard curve of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in 40% ethanol in PBS..... 64
10	The percentage of analytical recovery of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in methanol..... 67
11	The percentage of analytical recovery of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in 40% ethanol in PBS..... 67

LIST OF TABLES (cont.)

Table	Page
12	Data of within run precision of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in methanol..... 68
13	Data of within run precision of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in 40% ethanol in PBS..... 68
14	Data of between run precision of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in methanol..... 69
15	Data of between run precision of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in 40% ethanol in PBS..... 70
16	The percentage of isotropic area in pseudoternary phase diagram for cosurfactant free system..... 82
17	The percentage of isotropic area in pseudoternary phase diagram with caprylic/capric triglyceride as oil..... 83
18	The percentage of isotropic area in pseudoternary phase diagram with IPM as oil..... 84
19	pH and viscosity results of microemulsion preparation with and without Centella triterpene extract at 23 ± 0.5 °C..... 86
20	Droplet size results of microemulsion preparation without centella selected triterpene extract..... 88
21	Conductivity results of control at 23 ± 0.5 °C..... 89
22	Conductivity results of microemulsion preparations with and without Centella triterpene extract at 23 ± 0.5 °C..... 90

LIST OF TABLES (cont.)

Table		Page
23	Solubility of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid and various concentrations of ethanol in PBS.....	91
24	The percent remaining of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid...	103

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1	<i>Centella asiatica</i> (Linn.)..... 7
2	Structure of asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid (Brinkhaus, Lindner, Schuppan, and Hahn, 2000)..... 9
3	Diagrams illustrating the hard-sphere volume of (a) oil-in-water and (b)water-in-oil microemulsion droplets(Swarbrick and Boylan, 1994)..... 12
4	A steric model correlating the shape of the amphiphile to the spontaneous curvature of the interface (Swarbrick and Boylan, 1994)..... 14
5	Multidimensional representation of the phase behavior of four-component systems; the hatched area represents a fixed surfactant/cosurfactant ratio (Swarbrick and Boylan, 1994)..... 15
6	Winsor I, II, and III systems. Type I, oil-in-water microemulsion in equilibrium with excess oil; Type II, water-in-oil microemulsion in equilibrium with excess water; Type III, bicontinuous structures in equilibrium with excess oil and water (Swarbrick and Boylan, 1994)..... 17
7	The two dimensional spreading pressure and interfacial tension in film of soap and alcohol at oil/water interface (Krisri Umprayn, 1990)..... 18
8	Typical permeation profile for a molecule diffusing across human skin... 26
9	Schematic illustration of Franz diffusion cell..... 29
10	TLC chromatogram of asiaticoside, madecassoside, madecassic acid and asiatic acid..... 56

LIST OF FIGURES (cont.)

Figure	Page
11 HPLC chromatogram of mixtures of 400 µg/ml asiaticoside, 50 µg/ml prednisolone, 300 µg/ml madecassic acid and 300 µg/ml asiatic acid.....	57
12 HPLC chromatogram of 400 µg/ml asiaticoside standard solution.....	57
13 HPLC chromatogram of 100 µg/ml prednisolone standard solution.....	58
14 HPLC chromatogram of 300 µg/ml madecassic acid standard solution...	58
15 HPLC chromatogram of 300 µg/ml asiatic acid standard solution.....	59
16 HPLC chromatogram of components from fresh leaves extraction following A.1.....	60
17 HPLC chromatogram of components from fresh leaves extraction following A.2.....	60
18 HPLC chromatogram of sample solutions of blank solutions (A; methanol, B; 40% ethanol in isotonic PBS).....	62
19 Standard curve of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in methanol by HPLC method (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid)	65
20 Standard curve of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in 40% ethanol in PBS by HPLC method (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid).....	66
21 Characterization of liquid crystals and microemulsion under polarized light (A; nonbirefringence of microemulsion, B; nonbirefringence of liquid crystals, B1, B2; oily streaks, B3; fan shape, B4; maltese cross).....	72

LIST OF FIGURES (cont.)

Figure	Page
22 Ternary and pseudo-ternary phase diagrams with different surfactants (A; caprylic/capric triglyceride as oil, B; IPM as oil).....	74
23 Pseudoternary phase diagram with propan-2-ol as cosurfactant (A; caprylic/capric triglyceride as oil, B; IPM as oil).....	75
24 Pseudoternary phase diagram with propylene glycol as cosurfactant (A; caprylic/capric triglyceride as oil, B; IPM as oil).....	80
25 TEM images of microemulsions (x 20 K) (A; o/w microemulsion, w/o microemulsion).....	87
26 Permeation profiles of centella selected triterpene extract from microemulsion free from cosurfactant (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid).....	93
27 Comparison permeability from microemulsion with IPM and caprylic/capric triglyceride as oils. (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid), * P < 0.05.....	95
28 Comparison permeability between different surfactant from microemulsion using IPM as oils (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid), * P < 0.05.....	96
29 Permeation profiles of Centella triterpene extract from microemulsion using propan-2-ol (Formula 11) and propylene glycol (Formula 12) as cosurfactant comparing without non-cosurfactant (Formulation 7), (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid).....	98

LIST OF FIGURES (cont.)

Figure		Page
30	Permeation profiles of Centella triterpene extract from microemulsion using propan-2-ol as cosurfactant at different ratios. (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid).....	100
31	Permeation profiles of Centella triterpene extract from selected microemulsion (A; asiaticoside, B; madecassic acid and C; asiatic acid)...	102

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	=	analysis of variance
B.C.	=	bicontinuous
°C	=	degree celcius
CI	=	confidence interval
cm	=	centrimeter
cm ²	=	square centimetre
cps	=	centipoise
C.V.	=	coefficient of variation
d.f.	=	degree of freedom
et al.	=	et alii, and others
g	=	gram
HLB	=	hydrophilic lipohilic balance
hr	=	hour
HPLC	=	high performance liquid chromatography
i.m.	=	intramuscular
IPM	=	isopropyl myristate
i.v.	=	intravenous
kg	=	kilogram
ME	=	microemulsion
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliter
mm	=	millimeter

LIST OF ABBREVIATIONS (cont.)

m.p.	=	melting point
M.W.	=	molecular weight
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance
o/w	=	oil in water
PBS	=	phosphate buffered saline
pp	=	page
R ²	=	coefficient of determination
rpm	=	revolution per minute
s.c.	=	subcutaneous
S.D.	=	standard deviation
TEM	=	transmission electron microscopy
TLC	=	thin layer chromatography
μl	=	microliter
μm	=	micrometer
μg	=	microgram
μs	=	microsiemens
USP	=	United States Pharmacopoeia
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/o	=	water in oil
w/w	=	weight by weight