

การประเมินประสิทธิผลในการทำให้ผิวขาว และความคงตัวของ  
สารสกัดจากแก่นมะหาด

นางสาวคัมภีร์ ฝรั่งเรืองวงษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1217-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF SKIN WHITENING EFFICACY AND STABILITY OF  
*ARTOCARPUS LAKOOCHA* HEARTWOOD EXTRACT

Miss Koomkwan Pengrungrangwong



ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

Department of Pharmacy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1217-9

Thesis Title                      Evaluation of Skin Whitening Efficacy and Stability of *Artocarpus lakoocha* Heartwood Extract

By                                      Miss Koomkwan Pengrungrangwong


Field of Study                      Pharmacy

Thesis Advisor                      Associate Professor Parkpoom Tengamnuy, Ph.D.

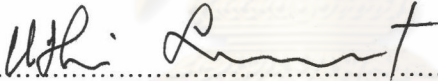
Thesis Co-Advisor                      Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.

---

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


  
..... Dean of Faculty of  
Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)


Thesis Committee

  
..... Chairman  
(Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D.)

  
..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Parkpoom Tengamnuy, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Pramote Theerapong, M.D., Ph.D.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Panida Vayumhasuwan, Ph.D.)

คัมภีร์ พงษ์เรืองวงศ์ : การประเมินประสิทธิผลในการทำให้ผิวขาว และความคงตัวของ สารสกัดจากแก่นมะหาด (EVALUATION OF SKIN WHITENING EFFICACY AND STABILITY OF *ARTOCARPUS LAKOOCHA* HEARTWOOD EXTRACT) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ภาคภูมิ เต็งอำนวยการ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาภูมิ, 155 หน้า. ISBN 974-03-1217-9.

การประเมินประสิทธิผลในการทำให้ผิวขาว และความคงตัวของสารสกัดจากแก่นมะหาด (ปวกหาด) และสารสกัดจากรากหาดหนูน ในผิวหนังหนูตะเภา และผิวหนังอาสาสมัครเพศหญิง ผลการทดสอบในผิวหนังหนูตะเภาหลังจากทาสารทดสอบทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสารละลายปวกหาดความเข้มข้น 0.5% ให้ผลทำให้ผิวขาวขึ้นดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คิดเป็นร้อยละของการทำให้ผิวขาวคือ 7.59 เมื่อเทียบกับสารละลายกรดโคจิกความเข้มข้น 3%, สารสกัดจากรากหาดหนูนความเข้มข้น 3% และโพรไพลีนไกลคอล ซึ่งให้ผิวขาวขึ้นร้อยละ 5.39, 5.27 และ 3.26 ตามลำดับ จึงเลือกสารละลายปวกหาดสำหรับการศึกษาในผิวหนังอาสาสมัคร โดยให้อาสาสมัครจำนวน 80 คนทาสารละลายปวกหาดความเข้มข้น 0.5%, 0.25%, สารสกัดจากชะเอมความเข้มข้น 0.25% และสารละลายกรดโคจิกความเข้มข้น 3% ที่แขนข้างหนึ่ง และแขนอีกข้างทาสารละลายควบคุม คือโพรไพลีนไกลคอลพบว่าสารละลายปวกหาดความเข้มข้น 0.25% มีผลทำให้ผิวขาวขึ้นดีที่สุด โดยให้ผลขาวขึ้นเร็วที่สุดภายใน 4 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และพบผลการระคายเคืองที่ผิวหนังน้อย เมื่อทำการศึกษาความคงตัวของกายภาพ และชีวเคมีของสารละลายปวกหาด และสารละลายปวกหาดที่เติมสารต้านออกซิเดชัน พบว่าการเติมสารต้านออกซิเดชันร่วมกัน 2 ชนิด คือ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ และบิวทิลเลตเตตไฮดรอกซีอะนิโซล ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด และผลการเปลี่ยนสีของสารละลายปวกหาดได้ จากข้อมูลของการศึกษานี้ จึงเป็นไปได้ที่ปวกหาดน่าจะใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ที่ดีกว่าสารสกัดจากชะเอม และกรดโคจิก นอกจากประสิทธิผลที่ดีในการทำให้ผิวขาวแล้ว ปวกหาดยังมีราคาไม่แพง และปลอดภัย จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกสำหรับการใช้ปวกหาดเป็นสารทำให้ผิวขาวในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมยาที่ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับผิวหนัง

ภาควิชา เกษตรกรรม  
สาขาวิชา เกษตรกรรม  
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4376557233 MAJOR: PHARMACY

KEY WORD: *ARTOCARPUS LAKOOCHA* / *A. GOMEZIANUS* / PUAG-HAAD / TYROSINASE  
INHIBITORS / WHITENING AGENT

KOOMKWAN PENGRUNGRUANGWONG: EVALUATION OF SKIN WHITENING EFFICACY AND  
STABILITY OF *ARTOCARPUS LAKOOCHA* HEARTWOOD EXTRACT. THESIS ADVISOR:  
ASSOC. PROF. PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.  
KITTISAK LIKHITWITAYAWUID, Ph.D. 155 pp. ISBN 974-03-1217-9.

The purposes of this study were to evaluate the *in vivo* skin whitening efficacy and irritation potential of the extracts of *Artocarpus lakoocha* heartwood (Puag-Haad) and *A. gomezianus* root (Haadnun) in guinea pigs and human volunteers. After 4 week-daily application of the two substances to the shaved areas of the guinea pig back skin, 0.5% Puag-Haad was found to be the most effective whitening agent giving the overall whitening of 7.59%, which was significantly greater than 3% kojic acid (5.38%), 3% Haadnun (5.27%) and propylene glycol (3.26%). Thus, Puag-Haad was chosen for further studies in human subjects. Eighty female volunteers participated in a parallel clinical trial with self-control to evaluate the skin whitening activity of 0.5%, 0.25% Puag-Haad, 0.25% licorice extract and 3% kojic acid. After daily application, 0.25% Puag-Haad was the most effective agent, giving the shortest onset time to detect significantly whitening effect at only after 4 weeks. The physical and biochemical stability of Puag-Haad aqueous solution, with and without antioxidants, were also studied. The best antioxidant combination that provided optimum protection against loss in % inhibition of mushroom tyrosinase and against changes in color was the mixture of sodium metabisulfite and butylated hydroxyanisole. These results suggested that Puag-Haad possessed potent tyrosinase inhibitory activity which was superior to licorice extract and kojic acid. Its irritation potential is also low since none of the subjects receiving 0.25% Puag-Haad complained of any serious skin reactions. Thus, the good safety and efficacy of Puag-Haad, coupled with the more economical price and availability, have made Puag-Haad a very promising alternative as a skin whitening agent or skin depigmenting agent in cosmetic and pharmaceutical industry.

Department Pharmacy

Field of study Pharmacy

Academic year 2001

Student's signature..... *K. Pong* .....

Advisor's signature..... *Parkpoom Tengamnuay* .....

Co-advisor's signature..... *K. Likhit* .....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Parkpoom Tengamnuay, for his excellent advice, guidance and great encouragement throughout my research study.

I would like to express my sincere thank to my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Kittisak Likhitwitayawuid of the Department Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for his kindness and valuable advice.

I would like to thank Dr. Wanchai De-Eknamkul of the Department Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for support of the Microplate reader used throughout this study.

I would like to give my thanks to Miss Chantra Cutchavare, head of department of pharmacy, Makarak Hospital who provided me a chance to continue my study in this master program.

I would like to thank Ouiheng Import Co., Ltd. for providing financial support and the Mexameter to conduct this investigation.

I would like to thank Mr. Booncho Sritularak and Mr. Perayot Pamonsilapatham for assistance and kindness.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family for their love, warmness and encouragement.

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEW.....	5
III. MATERIALS AND METHODS.....	22
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	40
V. CONCLUSION AND RECOMMENDED FUTURE EXPERIMENTS.....	105
REFERENCES.....	109
APPENDICES.....	114
VITA.....	155

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	The responses of melanocytes and the induction of Melanogenesis after exposure to sunlight	11
2	Skin-types I-VI according to Fitzpatrick classification.	12
3	The absolute melanin and erythema values (mean $\pm$ SD) in guinea pigs treated with different substances for 4 weeks. The pretreatment values (before UVB irradiation) are also provided. (n = 6-7 guinea pigs per group)	42
4	Percentage whitening after application of propylene glycol (negative control) to guinea pigs.	45
5	Percentage whitening after application of 3% w/v kojic acid (positive control) to guinea pigs.	45
6	Percentage whitening after application of 3% w/v Haadnun extract to guinea pigs.	46
7	Percentage whitening after application of 5% w/v Haadnun extract to guinea pigs.	46
8	Percentage whitening after application of 0.5% w/v Puag-Haad to guinea pigs.	47
9	Percentage whitening after application of 1.0% w/v Puag-Haad to guinea pigs.	47
10	The average baseline melanin values at 2 and 1week before application of treatments (week -2 and week -1). The values at the start of the experiment (week 0) are also shown. Data = mean $\pm$ SD (n = 20 subjects per group).	57
11	The absolute melanin values (mean $\pm$ SD) in the upper arms of human volunteers treated with different substances for 12 weeks. (n = 17-20 subjects per treatment group)	60



12	The average % whitening values (mean $\pm$ SD) in the upper arms of human volunteers treated with different substances for 12 weeks. (n = 17-20 subjects per treatment group)	61
13	% Whitening efficacy over corresponding control (difference in % whitening between product treated forearm and propylene glycol treated forearm) of 0.5% Puag-Haad in propylene glycol (n = 17)	67
14	% Whitening efficacy over corresponding control (difference in % whitening between product treated forearm and propylene glycol treated forearm) of 0.25% Puag-Haad in propylene glycol (n = 20)	68
15	% Whitening efficacy over corresponding control (difference in % whitening between product treated forearm and propylene glycol treated forearm) of 0.25% Licorice extract in propylene glycol (n = 20)	69
16	% Whitening efficacy over corresponding control (difference in % whitening between product treated forearm and propylene glycol treated forearm) of 3.0% Kojic acid in propylene glycol (n = 19)	70
17	The average erythema values (mean $\pm$ SD) in the upper arms of human volunteers treated with different substances for 12 weeks. (n = 17-20 subjects per group)	77
18	Changes in color of Puag-Haad samples at initial of the study and upon storage at room temperature	81
19	Changes in color of Puag-Haad samples at initial of the study and upon storage at 45 °C.	82
20	Changes in pH values of Puag-Haad samples at initial of the study and upon storage at room temperature	87
20/1	Changes in pH values of antioxidants at initial of the study and upon storage at room temperature	88
21	Changes in pH values of Puag-Haad samples at initial of the study and upon storage at 45 °C.	89
21/1	Changes in pH values of antioxidants at initial of the study and upon storage at 45 °C.	91

22	Precision of the enzymatic method used in determining tyrosinase inhibitory activity of whitening agents. 3% freshly prepared kojic acid solution was used as a reference standard	94
23	Stability at room temperature of Puag-Haad, Licorice extract and Kojic acid in 20% propylene glycol/ 80% water with respect to % tyrosinase inhibitory activity	95
24	Stability of Puag-Haad with and without antioxidants as determined from % tyrosinase inhibitory activity at room temperature. Data = mean $\pm$ SD (n = 3)	99
25	Stability of Puag-Haad with and without antioxidants as determined From % tyrosinase inhibitory activity relative to initial value at room temperature. Data = mean $\pm$ SD (n = 3)	100
26	Stability of Puag-Haad with and without antioxidants as determined from % tyrosinase inhibitory activity at 45 °C. Data = mean $\pm$ SD (n = 3)	101
27	Stability of Puag-Haad with and without antioxidants as determined from % tyrosinase inhibitory activity relative to initial value at 45 °C. Data = mean $\pm$ SD (n = 3)	102

## LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1	Chemical structural of 2, 4, 3',5'-tetrahydroxystilbene.	9
2	The epidermal melanin unit.	9
3	Morphologic and metabolic of epidural melanin presentation.	10
4	A cascade of melanogenesis after exposure to UVR.	13
5	Melanin-biosynthesis pathways in melanocytes.	16
6	Diagram depiction the irradiation process in a guinea pig by a UVB lamp.	25
7	Single square-shape area (A) design application of propylene glycol and kojic acid, two square-areas (B) design application of Haadnun and Puag-Haad	28
8	Histogram comparing % whitening of four substances after 2 and 4 weeks application in guinea pigs. Data = mean $\pm$ SEM (n = 6-7 guinea pigs/group)	50
9	Comparison of % whitening of Haadnun 3% and 5%. Data = mean $\pm$ SEM (n = 6 guinea pigs/group)	53
10	Comparison of % whitening of Puag-Haad 0.5% and 1.0%. Data = mean $\pm$ SEM (n = 7 guinea pigs/group)	54
11	Percent whitening after applying 0.50% Puag-Haad and propylene glycol for different times. Each point represents mean $\pm$ SEM (n = 17)	62
12	Percent whitening after applying 0.25% Puag-Haad and propylene glycol for different times. Each point represents mean $\pm$ SEM (n = 20)	63
13	Percent whitening after applying 0.25% Licorice extract and propylene glycol for different times. Each point represents mean $\pm$ SEM (n = 20)	64

- 14 Percent whitening after applying 3.00% Kojic acid and propylene glycol for different times. Each point represents mean  $\pm$  SEM (n = 19) 65
- 15 Histogram comparing % whitening efficacy (difference from corresponding control) of four products after 10 and 12 week-application in female volunteers. Data = mean  $\pm$  SEM (n = 17-20 subjects per group) 71
- 16 Physical appearances of Puag-Haad samples upon storage at room temperature and 45°C for 6 weeks 83
- 17 Physical appearances of Puag-Haad samples upon storage at room temperature and 45°C for 12 weeks 84
- 18 Physical appearances of Puag-Haad samples upon storage at room temperature and 45°C for 24 weeks 85
- 19 Plots of % tyrosinase inhibitory activity (relative to initial value) remaining after storage at room temperature up to 24 weeks. Each point represents mean (n=3) 103
- 20 Plots of % tyrosinase inhibitory activity (relative to initial value) remaining after storage at 45°C up to 24 weeks. Each point represents mean (n=3) 104

## LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	=	Analysis of variance
°C	=	Degree Celcius
cm	=	Centimeter
DT	=	Delayed tanning
g	=	Gram
IC <sub>50</sub>	=	Median inhibitory concentration
IT	=	Immediate tanning
Kg	=	Kilogram
L	=	Liter
L-DOPA	=	L-3,4-dihydroxyphenyl anlanine
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
nm	=	Nanometer
μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
SD	=	Standard deviation
SEM	=	Standard error of mean
UV	=	Ultraviolet
UVR	=	Ultraviolet radiation
UVA	=	Ultraviolet A
UVB	=	Ultraviolet B
v/v	=	Volume by volume
w/v	=	Weight by volume
wk	=	Week