

การประเมินความคงตัว ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นมะหาด



นางสาว กาญจนา วชิรนนท์ศิลป์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม


คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4216-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF STABILITY, ANTIOXIDATIVE AND FREE RADICAL
SCAVENGING ACTIVITIES OF *ARTOCARPUS LAKOOCHA*
HEARTWOOD EXTRACT



Miss Kanjana Wachiranuntasin

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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


Department of Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-17-4216-9

Thesis Title Evaluation of stability, antioxidative and free radical scavenging activities of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract
By Miss Kanjana Wachiranuntasin
Field of study Pharmaceutics
Thesis Advisor Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, 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

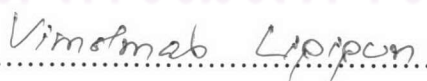

.....Dean of the Faculty of
Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Suchada Chutimaworapan, Ph.D.)


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


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


.....Member
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)


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

กาญจนา วชิรนนท์ศิลป์: การประเมินความคงตัว ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระของ สารสกัดจากแก่นมะหาด. (EVALUATION OF STABILITY, ANTIOXIDATIVE AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES OF *ARTOCARPUS LAKOOCHA* HEARTWOOD EXTRACT) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วูฒิ, 198 หน้า. ISBN 974-17-4216-9.

การประเมินความคงตัวทางกายภาพ และชีวเคมีของสารละลายของสารสกัดจากแก่นมะหาด (ปวก หาด) และสารละลายปวกหาดที่เติมสารต้านออกซิเดชัน พบว่าการเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์เดี่ยวๆ หรือ ร่วมกับบิวทิลไฮดรอกซีอะนิโซลและโรวีโซมสามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนสีของสารละลายปวกหาดได้ พบว่าในช่วงเวลาที่ศึกษาความคงตัวเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งที่มีหรือไม่มีสาร ต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างกันเนื่องจากเกิดการอ้อมตัวของเอนไซม์ไทโรซิเนสภายใต้สภาวะที่ศึกษา นอกจากนี้ ยังได้สกัดออกซีเรสเวอรอลจากปวกหาดโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งให้ผลผลิต 14.83% สำหรับฤทธิ์ ต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นมะหาดนั้น ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ดีพีพี เอช, ซูเปอร์ออกไซด์, ไฮดรอกซิล และซิงเกลต ออกซิเจน พบว่าปวกหาดและออกซีเรสเวอรอลมีฤทธิ์ใน การยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชใกล้เคียงกัน โดยมีฤทธิ์น้อยกว่าสารต้านออกซิเดชันที่ใช้เปรียบเทียบ (IC_{50} 8.25 และ 8.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) เช่นเดียวกันกับฤทธิ์ในการยับยั้งซูเปอร์ออกไซด์ ปวกหาดและออกซีเรส เวอรอลก็ให้ผลใกล้เคียงกัน (IC_{50} 46.11 และ 44.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้ง อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลนั้น พบว่าปวกหาดและออกซีเรสเวอรอลมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับอิพิเกลโลแคททีซิน แกลเลต แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าโพรออกซ์และวิตามินซี (IC_{50} 9.47 และ 7.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) นอกจากนี้ใน การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งซิงเกลต ออกซิเจน โดยวิธีวัดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงนั้นพบว่าปวกหาด และออกซี เรสเวอรอล มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดจากเปลือกสนและมีฤทธิ์ดีกว่าอิพิเกลโลแคททีซินแกลเลต โดย พบว่าวิตามินซีและโพรออกซ์ ไม่สามารถยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงได้ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (200 - 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) จากข้อมูลการศึกษานี้พบว่าปวกหาดและออกซีเรสเวอรอลมีความ สามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันชนิดอื่นๆที่ใช้ใน เครื่องสำอาง และเนื่องจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากแก่นมะหาดหรือปวกหาด ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร่วมกับปวกหาดมีราคาไม่แพง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่น่า สารสกัดจาก แก่นมะหาดหรือปวกหาดมาใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันทั้งในแง่เภสัชกรรมและทางด้านเครื่องสำอางต่อไป

ภาควิชา เกษษกรรม
สาขาวิชา เกษษกรรม
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..... กานจนา วชิรนนท์ศิลป์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ศาสตราจารย์ ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4576552233 : MAJOR PHARMACY

KEYWORD : *ARTOCARPUS LAKOOCHA*/ PUAG-HAAD/MA-HAAD/TYROSINASE
INHIBITORS/ FREE RADICAL SCAVENGING

KANJANA WACHIRANUNTASIN: EVALUATION OF STABILITY,
ANTIOXIDATIVE AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES OF
ARTOCARPUS LAKOOCHA HEARTWOOD EXTRACT. THESIS ADVISOR:
ASSOC. PROF. PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D., THESIS CO-
ADVISOR: ASSOC. PROF. KITTISAK LIKHITWITAYAWUID, Ph.D. 198 pp.
ISBN 974-17-4216-9.

This study was aimed to determine the physical and biochemical stabilities of dried aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*, Ma-Haad (Puag-Haad) in solution, with and without antioxidants. Addition of sodium metabisulfite, either alone or in combination with BHA and Rovisome[®] was able to maintain the original color. After 24 weeks, the values of % tyrosinase inhibition of Puag-Haad solutions, with and without stabilizers, were not different among each other. However, this could be due to saturation of tyrosinase under the current testing conditions. Oxyresveratrol was also purified from Puag-Haad by column chromatography and the yield was 14.83 % w/w. Antioxidant properties of Puag-Haad was subsequently tested for the scavenging effect on DPPH radical, superoxide anion, hydroxyl radical and singlet oxygen. Puag-Haad and oxyresveratrol exhibited a comparable but generally lower antioxidant activity against DPPH than other reference antioxidants ($IC_{50} = 8.25$ and $8.78 \mu\text{g/ml}$, respectively). Similar result was found in the superoxide anion scavenging activity with the IC_{50} of $46.11 \mu\text{g/ml}$ for Puag-Haad and $44.31 \mu\text{g/ml}$ for oxyresveratrol. Regarding the hydroxyl radical scavenging activity, Puag-Haad and oxyresveratrol appeared to have potency comparable to EGCG but slightly less potent than l-ascorbic acid and Trolox[®]. The IC_{50} values were 9.47 and $7.41 \mu\text{g/ml}$, respectively. Singlet oxygen scavenging activity was carried out via red blood cell hemolysis test. Puag-Haad, oxyresveratrol and pine bark extract were equally potent singlet oxygen scavengers whereas EGCG was much less effective. On the other hand, l-ascorbic acid and Trolox[®] did not show any anti-hemolytic activity in the concentration range studied (200 - $600 \mu\text{g/ml}$). These results suggested that Puag-Haad and oxyresveratrol were capable of scavenging several reactive oxygen species with varying potency when compared to other antioxidants commonly used in the cosmetic products. Considering its various antioxidative properties together with the previously reported antityrosinase activity, the inexpensive and easily available *A. lakoocha* extract or Puag-Haad has a very promising potential for use as an antioxidant ingredient for both the pharmaceutical and cosmetic applications.

Department Pharmacy
Field of study Pharmaceutics
Academic year 2005

Student signature.....*Enjin W.*
Advisor's signature.....*Parkpoom Tengamnuay*
Co-advisor's signature.....*K. Likhit*

ACKNOWLEDGEMENTS

The success of my thesis would never have happened without valuable support and advice from many people who contributed to my experience.

The completion of this thesis would have not been possible without the devote concentration, continuous care, valuable suggestion and guidance of my advisor, Associate Professor Dr. Parkpoom Tengamnuay. I also appreciate the warm assistance and invaluable advice rendered by my co-advisor, Associate Professor Dr. Kittisak Likhitwitayawuid. Indeed, I am sincerely grateful to my advisor and co-advisors, who helped me achieve such an outstanding success.

I would like to thank Dr. Wanchai De-Eknamkul of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for allowing the use of a microplate reader throughout this study.

I would like to thank Dr. Boonchoo Sritularak of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for his kindness and helpful guidance in *Artocarpus lakoocha* extraction.

A special acknowledgement is extended to the Department of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for the support of equipment and laboratory space in this study, I also want to express special thanks to my friends for their moral support and warm encouragement during my study. Sincere thanks are also given to all staff members of the Department of Pharmacy and other people whose names have not been mentioned for their assistance and great helpful support.

Finally, I am particularly indebted to my family for their love and understanding. I would like to thank them for their continuous care and tremendous encouragement throughout my study.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	4
<i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb	4
Aging and the Skin.....	8
Free Radical and Oxidation Reaction.....	16
Antioxidant Mechanisms.....	22
Measurement of Antioxidants Activity.....	28
Stability of Cosmetic Preparations and Role of Antioxidants	29
III MATERIALS AND METHODS.....	31
Crude Drug.....	31
Materials.....	31
Reference Antioxidants.....	32
Reference Antityrosinase Agent.....	33
Apparatus	33
Methods.....	34
IV RESULTS AND DISSCUSSION.....	52
Extraction and Isolation of Active Constituent (oxyresveratrol) from aqueous Extract of <i>Artocarpus lakoocha</i> Heartwood (Puag-Haad)....	52
Stability Evaluation of Aqueous Extract of <i>Artocarpus lakoocha</i> Heartwood (Puag-Haad) Solutions.....	58

	Page
Determination of Antioxidants and Free Radical Scavenging Activities of <i>Artocarpus lakoocha</i> Heartwood Extract (Puag- Haad).....	74
V CONCLUSIONS.....	119
REFERENCES.....	123
APPENDICES.....	133
VITA.....	198



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Reactive oxygen and nitrogen species	17
2	Defense systems in vivo against oxidative damage.....	21
3	The ratios and volumes of solvents for quick column chromatography of methanol extract of <i>Artocarpus lakoocha</i>	34
4	The initial and final concentration ($\mu\text{g/ml}$) of the test sample.....	42
5	The extraction of Puag-Haad by quick column chromatography.....	52
6	Changes in color of Puag-Haad solutions upon storage at ambient temperature.....	62
7	Changes in pH values of Puag-Haad solutions upon storage at ambient temperature for 24 weeks.....	64
8	Changes in pH values of antioxidant solutions without Puag-Haad upon storage at ambient temperature for 24 weeks.....	65
9	Precision of the enzymatic method used in determining tyrosinase inhibitory activity. 0.25% freshly prepared licorice extract solution was used as a reference standard.....	67
10	Stability of Puag-Haad with and without antioxidants as determined from % tyrosinase inhibitory activity	71
11	Stability of Puag-Haad with and without antioxidants as determined from % tyrosinase inhibitory activity relative to their initial value.....	71
12	DPPH radical inhibition of Puag-Haad compared to other antioxidants at various concentrations	76
13	The IC_{50} values of the DPPH radical inhibition of each antioxidant, and R^2 (Regression coefficient) of the correlation between inhibition percentage and the first portion of concentrations calculated from polynomial regression.....	78

Table	Page
14	Inhibition of superoxide anion from riboflavin photo-oxidation by Puag-Haad compared to other antioxidants at various concentrations 87
15	The IC ₅₀ values for superoxide anion inhibition of each antioxidant The R ² is the regression coefficient obtained from polynomial regression of the initial portion of the plot between the inhibition percentage and the initial concentration of each antioxidant..... 89
16	Hydroxyl free radical inhibition percentages of Puag-Haad compared to other antioxidants at various concentrations..... 99
17	The IC ₅₀ values for hydroxyl free radical inhibition of each antioxidants. The R ² is the regression coefficient obtained from polynomial regression of the initial portion of the plot between inhibition percentage and the initial range of concentration of each antioxidant..... 101
18	Comparison of percent hemolysis before and after UV irradiation obtained from samples with and without antioxidants..... 110
19	Percent hemolysis at 90 min after correction for the non-UV induced hemolysis 111
20	Comparison of percent relative hemolysis at 90 min among the six antioxidants. The data are normalized in relation to the individual antioxidant's control group..... 111
21	The IC ₅₀ values for hemolysis inhibition of each antioxidant..... 115

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	<i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. (Ma-Haad).....	5
2	Chemical structure of oxyresveratrol or 2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene..	5
3	Puag-Haad.....	7
4	Basic structure of the skin.....	12
5	Free radicals formation and its deleterious effects.....	15
6	Diminishing radical-induced cell damage; a = radical formation prevention; b = radical scavenging; c = repair of radical-induced damage.	22
7	Structure of Trolox [®] , vitamin C, vitamin E, and EGCG.....	27
8	Rotary evaporator	35
9	Microplate Reader, Model 450.....	38
10	Structure of DPPH and reaction with an antioxidant.....	42
11	Quick column chromatography (a) and gel column chromatography (b)...	53
12	TLC chromatogram of the fractions under UV 254 nm.....	53
13	TLC chromatogram of the pure compound under UV 254 nm.....	54
14	Photograph of oxyresveratrol or 2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene.....	54
15	The UV spectrum of oxyresveratrol (0.001 mg/ml in MeOH).....	55
16	¹ H NMR spectrum of oxyresveratrol.....	56
17	¹³ C NMR spectrum of oxyresveratrol.....	57
18	Physical appearance of Puag-Haad solutions upon storage at ambient temperature for 24 weeks.....	63
19	(a) Absorbance of positive control (enzyme and substrate) (b) Tyrosinase inhibition percentage at difference time (enzyme plus substrate and and licolice extract).....	66
20	Percent tyrosinase inhibitory activity remaining after storage up to 24 weeks. Each point represents Mean ± SD (n=3). P = 0.25% Puag- Haad, A1 = 0.10% Sodium metabisulfite, A2 = 0.01% BHA, A3 = Rovisome, A4 = A1 + A2, A5 = A1 + A2 + A3.....	72

Figure	Page	
21	Percent tyrosinase inhibitory activity (relative to initial value) remaining after storage up to 24 weeks. Each point represents Mean \pm SD (n = 3). P = 0.25% Puag-Haad, A1 = 0.10% Sodium metabisulfate, A2 = 0.01% BHA, A3 = Rovisome [®] , A4 = A1 + A2, A5 = A1 + A2 + A3.....	72
22	Percent tyrosinase inhibition of Puag-Haad solution a) and oxyresveratrol (b).....	73
23	DPPH radical inhibition percentage of Puag-Haad compared to other antioxidant at various concentrations	77
24	The relationship between DPPH radical inhibition percentage and the concentration of the antioxidants.....	77
25	Comparison between the actual curve (dotted line) and the regression curve (solid line) of the initial portion of the % DPPH inhibition-concentration profile of each antioxidant. The polynomial regression equation for determining the IC ₅₀ and the regression coefficient (R ²) are also provided for the individual antioxidants.....	79
26	The IC ₅₀ (μ g/ml) of each antioxidant in DPPH radical inhibition	82
27	DPPH radical inhibition percentage of each antioxidant at various concentrations	83
28	The extent of superoxide anion inhibition by Puag-Haad as a function of concentration in comparison with other antioxidants	87
29	The extent of superoxide anion inhibition and concentration for each antioxidant	88
30	Comparison between the actual curve (dotted line) and the regression curve (solid line) of the initial portion of the % superoxide anion inhibition-concentration profile of each antioxidant. The polynomial regression equation for determining the IC ₅₀ and the regression coefficient (R ²) are also provided for the individual antioxidants.....	90

Figure		Page
31	Comparison of IC ₅₀ (μg/ml) of the six antioxidants	92
32	Comparison of superoxide anion inhibition extent of the six antioxidants at various concentrations.....	95
33	The extent of hydroxyl radical inhibition by Puag-Haad as a function of concentration in comparison with other antioxidants....	100
34	The extent of hydroxyl radical inhibition of each antioxidant.....	100
35	Comparison between the actual curve (dotted line) and the regression Curve (solid line of the initial portion of the % hydroxyl radical inhibition-concentration profile of each antioxidant. The polynomial regression equation for determining the IC ₅₀ and the regression coefficient (R ²) are also provided for the individual antioxidants.....	102
36	The IC ₅₀ values for hydroxyl free radical inhibition of each antioxidant..	104
37	Comparison of hydroxyl radical inhibition extent of the six antioxidants at the concentration of 5.0 μg/ml, 10.0 μg/ml and the highest test concentration.....	107
38	Percent hemolysis of the six antioxidants at various concentrations.....	112
39	Percent relative hemolysis of the six antioxidants at various concentrations.....	113

LIST OF ABBREVIATIONS

abs	=	absorbance
ANOVA	=	analysis of variance
°C	=	degree of Celcius
cm	=	centimeter
conc.	=	concentration
CHCl ₃	=	chloroform
¹³ C-NMR	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
CV	=	coefficient of variation
diam	=	diameter
e.g.	=	exempli gratia, for example
<i>et al.</i>	=	et alii, and others
<i>etc.</i>	=	et cetera
g	=	gram
H ₂ O	=	water
H ₂ O ₂	=	hydrogen peroxide
HO·	=	hydroxyl radial
hr	=	hour
IC ₅₀	=	median inhibitory concentration
m	=	meter
MeOH	=	methanol
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar

mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
mW	=	milliwatt
min	=	minute
MW	=	molecular weight
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance
no.	=	number
%	=	percentage
PBS	=	phosphate buffer solution
pH	=	the negative logarithm of the hydrogen ion concentration
R ²	=	regression coefficient
RBC	=	red blood cell
rpm	=	revolution per minute
¹ O ₂	=	singlet oxygen
SD	=	standard deviation
O ₂ ⁻	=	superoxide anion
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet
UV-VIS	=	ultraviolet and visible spectrophotometry
v/v	=	volume by volume
λ _{max}	=	wavelength at maximal absorption

w/v = weight by volume

w/w = weight by weight

wk = week



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย