

FORMULATION OF OIL-IN-WATER EMULSIONS CONTAINING
SPRAY-DRIED TAMARIND PULP EXTRACT
AND WHITENING EFFICACY TEST
IN VOLUNTEERS

Miss Rattana Songmek

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 Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

การตั้งตำรับอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีส่วนผสมของผงแป้งแห้งจาก
สารสกัดเนื้อมะขามและการทดสอบประสิทธิภาพ
การทำให้เกิดผิวขาวในอาสาสมัคร

นางสาวรัตนา ทรงเมฆ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

500633

Thesis Title FORMULATION OF OIL-IN-WATER EMULSIONS
CONTAINING SPRAY-DRIED TAMARIND PULP
EXTRACT AND WHITENING EFFICACY TEST IN
VOLUNTEERS
By Miss Rattana Songmek
Field of Study Pharmaceutics
Thesis Advisor Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Porntip Nimmannitya, M.Sc. in Pharm.

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

..... *Suchada Chutinaworapan* Chairman
(Associate Professor Suchada Chutinaworapan, Ph.D.)

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

..... *Porntip Nimmannitya* Thesis Co-advisor
(Associate Professor Porntip Nimmannitya, M.Sc. in Pharm.)

..... *Sunanta Pongsamart* Member
(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

..... *Pornpen Weerawatganone* Member
(Assistant Professor Pornpen Weerawatganone, Ph.D.)

รัตนา ทรงเมฆ : การตั้งตำรับอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีส่วนผสมของผงพ่นแห้งจากสารสกัดเนื้อมะขามและการทดสอบประสิทธิภาพการทำให้เกิดผิวขาวในอาสาสมัคร.
(FORMULATION OF OIL-IN-WATER EMULSIONS CONTAINING SPRAY-DRIED TAMARIND PULP EXTRACT AND WHITENING EFFICACY TEST IN VOLUNTEERS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.พรทิพย์ นิมมานนิตย์, 125 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมผงสารสกัดจากเนื้อมะขามโดยวิธีการพ่นแห้ง เตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่ผสมผงพ่นแห้งจากสารสกัดเนื้อมะขามให้มีความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี ศึกษาประสิทธิภาพการทำให้เกิดผิวขาวและการเพิ่มความชุ่มชื้นของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีส่วนผสมผงพ่นแห้งจากสารสกัดเนื้อมะขามในอาสาสมัคร การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดทาร์ทาริกในสารสกัดจากเนื้อมะขาม ผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามและอิมัลชันที่มีส่วนผสมผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขาม เตรียมสารสกัดจากเนื้อมะขามให้เป็นผงแห้งโดยวิธีการพ่นแห้ง สภาวะที่ได้ผงพ่นแห้งที่ดีที่สุดคือสภาวะการพ่นแห้งที่มีอะคาเซีย ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิในการฉีดสาร 110 °ซ ความเร็วลมระดับ 50 ได้ผลผลิตผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามร้อยละ 55.73 ± 4.75 มีความชื้นร้อยละ 6.41 ± 0.64 รูปร่างของอนุภาคเป็นทรงกลม พื้นผิวเรียบ มีการเกาะตัวกันของกลุ่มอนุภาคเล็กน้อย ปริมาณกรดทาร์ทาริกที่มีในผงพ่นแห้ง 7.83 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทดสอบความคงตัวของผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามเมื่อเก็บไว้ในขวดใสและขวดป้องกันแสง ปิดสนิทอุณหภูมิแบบเร่งที่ 40 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 5 % เป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณของกรดทาร์ทาริกในผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามที่เก็บไว้ในขวดใสและขวดป้องกันแสงลดลงเล็กน้อยมีปริมาณเหลืออยู่เท่ากันคือร้อยละ 93.16 เปอร์เซ็นต์ นำผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามมาเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อิมัลชันมีความคงตัวดีทั้งทางกายภาพและทางเคมีที่อุณหภูมิห้องตลอดการทดสอบในอาสาสมัครเป็นเวลา 6 สัปดาห์ การทดสอบประสิทธิภาพการทำให้เกิดผิวขาวและความชุ่มชื้นในอาสาสมัครหญิงสุขภาพดีจำนวน 35 คนอายุในช่วง 20-45 ปีที่บริเวณหน้าผากโดยใช้อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามและกลุ่มควบคุมใช้ครีมเบสทาว์นละสองครั้ง เช้าและเย็น เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วัดความชุ่มชื้นของผิวและปริมาณเมลานิน พบว่าอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามให้ความชุ่มชื้นตั้งแต่สัปดาห์แรกและเพิ่มมากกว่าอิมัลชันเบส โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.000) ตั้งแต่สัปดาห์ที่สามหลังการทาและปริมาณเมลานินลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับอิมัลชันเบสหลังจากใช้อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีผงพ่นแห้งสารสกัดจากเนื้อมะขามในระยะเวลา 4 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.035)

ภาควิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่อนิสิต.....	งตพ	ทางานง
สาขาวิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....		
ปีการศึกษา	2550	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....	พรทิพย์	นิมมานนิตย์

4876597833 : MAJOR PHARMACY

KEY WORD: TAMARIND / SPRAY DRYING / EMULSION / WHITENING

RATTANA SONGMEK : FORMULATION OF OIL-IN-WATER EMULSIONS CONTAINING SPRAY-DRIED TAMARIND PULP EXTRACT AND WHITENING EFFICACY TEST IN VOLUNTEERS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. UBONTHIP NIMMANNIT, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PORNTIP NIMMANNITYA, M.Sc IN PHARM, 125 pp.

The aims of this study were to prepare spray-dried tamarind pulp extract and oil-in-water emulsions containing tamarind pulp extract. Physical and chemical properties were studied. Whitening and moisturizing efficacies of oil-in-water emulsion containing spray-dried tamarind pulp extract in volunteers were evaluated. Analytical method for determining tartaric acid in tamarind pulp, spray-dried tamarind pulp extract and oil-in-water emulsion containing spray-dried tamarind pulp extract were developed. In the preparation of spray-dried tamarind pulp extract, 10 %w/w acacia, inlet temperature 110 °C, fan setting 50 were successful for spray drying tamarind pulp extract. Percent yield of spray-dried tamarind pulp extract was 55.73 ± 4.75 %, percent moisture content was 6.41 ± 0.64 %, spherical and smooth surface with slightly aggregated particles were obtained. The spray-dried tamarind pulp extract contained 7.83 ± 0.13 % w/w of tartaric acid. Stability of spray dried products were determined by keeping in tight, clear or light protected vials at accelerated temperature 40 ± 2°C, relative humidity 75 ± 5% for 6 months. Amount of tartaric acid in spray-dried product was slightly decreased, finally, percent remaining of tartaric acid in both vials was as same as 93.16 % w/w. Eight percents by weight of spray-dried tamarind pulp extract was incorporated into oil-in-water emulsions. The prepared emulsions showed good physical and chemical stability at the ambient temperature for 6 weeks. Whitening and moisturizing efficacies of oil-in-water emulsion containing tamarind pulp extract using oil-in-water emulsion base as a control were tested in 35 healthy female volunteers which age in range 20 – 45 years. Tested and control sample of emulsions were applied on forehead twice per day for 6 weeks. Melanin value and moisture content were determined. After using emulsion containing spray-dried tamarind pulp extract, moisturizing value was increased in first week and significantly increased in three weeks more than using oil-in-water emulsion (p=0.000), melanin value at forehead was significantly decreased in four weeks more than using oil-in-water emulsion base (p=0.035).

Department: Pharmacy
Field of Study: Pharmacy
Academic Year: 2007

Student's Signature *Rattana Songmek*
Advisor's Signature *Ubonthip Nimmannit*
Co-advisor's Signature *Pornthip Nimmannitya*

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would not be successful without the great assistance of several people. I shall forever be in great debts for their helps, supports and advices.

First of all, I would like to express my profound gratitude to my advisor, Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D for her invaluable advice, guidance and enthusiastic encouragement throughout my research study. Her understanding, kindness and patience are honestly appreciated.

I would like to express deep appreciation and grateful thanks to my co-advisor, Associate Professor Pornpip Nimmannitya, M.Sc. in Pharm., for her valuable suggestion of many problems, kindness and encouragement.

I would like to express my gratitude to Associate Professor Suchada Chutimaworapan, Ph.D., Chairman of my thesis examination committee, as well as other committee members. I am grateful to Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D. and Assistant Professor Pornpen Werawatganone, Ph.D., for in kind advice and depth reviews that make this thesis complete.

This investigation was supported in part by a grant from The National Research Council of Thailand, Drug and Cosmetic Delivery Research Unit, to which I am extremely grateful.

My gratitude is given to Adinop Co., Ltd. for Micropearl M305 and MP 2700, Summit chemical Co., Ltd. for Dow corning[®] 9045 and Nutrition Ltd. for Maltodextrin.

Sincere thanks are also given to all staff members of Department of Pharmacy, Department of Manufacturing Pharmacy, Department of Food Chemistry and Center Laboratories for their assistance and great helpful support and other people whose name have not been mentioned here.

Finally, I would like to express my sincere and deepest gratitude to my family for endless love, understanding and encouragement throughout this study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEWS.....	5
Tamarind.....	5
Tamarind pulp.....	10
Skin color.....	13
Skin lightening agent.....	14
Spray drying.....	16
Emulsions.....	23
III MATERIALS AND METHODS.....	30
Chemicals.....	30
Accessories.....	31
Equipments.....	31
Methods.....	32
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	51
Preparation of tamarind pulp extract.....	51
Determination of tartaric acid in tamarind pulp extract.....	52
Preparation of spray-dried tamarind pulp extract.....	63
Formulation of oil-in-water emulsions containing spray-dried tamarind pulp extract.....	79
Study of whitening efficacy test in volunteers.....	91
V CONCLUSIONS.....	95
REFERENCES.....	96

Page

APPENDICES.....	100
VITA.....	125

LIST OF TABLES

Tables	Page
1 Classification of depigmenting agents.....	15
2 Emulsifiers and Stabilizers Used in Emulsions.....	25
3 Component Ratios for the Preparation of Primary Emulsions.....	26
4 The 2 ⁵ factorial designs for studying factors effected on properties of spray-dried tamarind pulp extract.....	42
5 Formulation of oil-in-water emulsion (cream base).....	46
6 Physical and chemical properties of tamarind pulp extract.....	51
7. Tartaric acid in tamarind pulp.....	52
8 Calibration curve data of tartaric acid by HPLC method.....	60
9 The inversely estimate concentration of tartaric acid in solution by HPLC method.....	61
10 The percentage of estimate concentration of tartaric acid.....	61
11 The inversely estimate concentration of tartaric acid in emulsion by HPLC method.....	62
12 The percentage of estimate concentration of tartaric acid in emulsion by HPLC method.....	62
13 Data within run precision of tartaric acid by HPLC method.....	62
14 Data between run precision of tartaric acid by HPLC method.....	63
15 Characteristic of spray-dried tamarind pulp extract keep in desicator.....	69
16 The particle sizes and size distribution of spray-dried tamarind pulp extract	75
17 Appearance of oil-in-water emulsion base before heating cooling cycle test	81
18 Appearance of oil-in-water emulsion base after heating cooling cycle test ..	83
19 Appearance of oil-in-water emulsion containing tamarind pulp extract before heating cooling cycle test.....	85
20 Appearance of oil-in-water emulsion containing tamarind pulp extract after heating cooling cycle test	87
21 Stability of oil-in-water emulsion base formulation 20	89

Tables	Page
22	Stability of oil-in-water emulsions containing 8 % w/w spray-dried tamarind pulp extract formulation 20T 90
23	Density of tamarind pulp extract lot no. R001 101
24	Density of tamarind pulp extract lot no. R002 101
25	Density of tamarind pulp extract lot no. R003 102
26	Viscosity of tamarind pulp extract 102
27	pH of tamarind pulp extract 102
28	Data titratable acidity of tamarind pulp extract Lot no.R001 103
29	Data titratable acidity of tamarind pulp extract Lot R002 103
30	Data titratable acidity of tamarind pulp extract Lot R003 104
31	Soluble solid in tamarind pulp extract 104
32	Data of tartaric acid in tamarind pulp extract 104
33	Data of tartaric acid in tamarind pulp 105
34	Data for percent yield of 32 experimental spray-dried tamarind pulp extract 106
35	Data percentage moisture content of 32 experiment spray-dried 108
36	Data repeated condition for spray-dried tamarind pulp extract 109
37	Displayed size of spray-dried tamarind pulp extract 111
38	Tartaric acid in spray-dried tamarind pulp extract 111
39	Stability data of percent remaining of tartaric acid of spray-dried tamarind pulp extract in clear vial 111
40	Stability data of percent remaining of tartaric acid of spray-dried tamarind pulp extract in light protected vial 112
41	Stability data of percent moisture content of spray-dried tamarind pulp extract in clear vial 112
42	Stability data of percent moisture content of spray-dried tamarind pulp extract in light protected vial 112
43	pH of oil-in-water emulsion base 113

Tables	Page
44	pH of oil-in-water emulsion containing 8 % w/w spray-dried tamarind pulp extract..... 114
45	Stability data of percent remaining of tartaric acid of oil-in-water emulsion containing 8 % w/w spray-dried tamarind pulp extract at ambient temperature 115
46	Mean melanin value at forehead of oil-in-water emulsion base group 116
47	Mean melanin value at forehead of oil-in-water emulsion containing 8 % w/w tamarind pulp extract 118
48	Mean moisture value at forehead of oil-in-water emulsion base 120
49	Mean moisture value at forehead of oil-in-water emulsion containing 8 % w/w spray-dried tamarind pulp extract 122
50	Pair t-test of difference mean melanin value and difference mean moisture value 124

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Tamarind tree.....	6
2	Fruits of tamarind.....	10
3	Structure of tartaric acid.....	11
4	Structure of malic acid.....	12
5	Structure of citric acid.....	12
6	Refractometer.....	34
7	Chromatogram of 0.05 mM KH_2PO_4 pH2. 5.....	53
8	Chromatogram of tartaric acid solution.....	53
9	Chromatogram of malic acid solution.....	54
10	Chromatogram of vitamin C solution.....	54
11	Chromatogram of acetic acid solution.....	54
12	Chromatogram of citric acid solution.....	55
13	Chromatogram of tamarind pulp extract.....	55
14	Chromatogram of tamarind pulp extract and acetic acid solution.....	55
15	Chromatogram of acacia solution.....	56
16	Chromatogram of spray-dried tamarind pulp extract.....	56
17	Chromatogram of spray-dried tamarind pulp extract and acetic acid (internal standard).....	57
18	Chromatogram of oil-in-water emulsion.....	57
19	Chromatogram of oil-in-water emulsion with tartaric acid.....	58
20	Chromatogram of oil-in-water emulsion with acetic acid (internal standard).....	58
21	Chromatogram of oil-in-water emulsion containing 8 % w/w spray-dried tamarind pulp extract.....	58
22	Chromatogram of oil-in-water emulsion containing 8 % w/w spray-dried tamarind pulp extract and acetic acid (internal standard).....	59
23	Calibration curve of tartaric acid by HPLC method.....	60
24	Percentage yield of 32 experimental spray-dried.....	64
25	Percentage moisture content of 32 experiment spray-dried.....	67

Figure	Page
26	Percentage yield of six formulation spray-dried tamarind pulp extract in collecting chamber..... 70
27	Percentage moisture content of six formulation spray-dried tamarind pulp extract in collecting chamber..... 71
28	Morphology of spray-dried tamarind pulp extract Experiment 1 Resolution x100 (a) and x 1000 (b)..... 71
29	Morphology of spray-dried tamarind pulp extract Experiment 3 Resolution x100 (a) and x 1000 (b)..... 72
30	Morphology of spray-dried tamarind pulp extract Experiment 17 Resolution x100 (a) and x 1000 (b)..... 72
31	Morphology of spray-dried tamarind pulp extract Experiment 19 Resolution x100 (a) and x 1000 (b)..... 73
32	Morphology of spray-dried tamarind pulp extract Experiment 23 Resolution x100 (a) and x 1000 (b)..... 73
33	Morphology of spray-dried tamarind pulp extract Experiment 24 Resolution x100 (a) and x 1000 (b)..... 74
34	Spray-dried tamarind pulp extract from experiment 23..... 76
35	The percent remaining of tartaric acid in spray-dried tamarind pulp extract 77
36	The percent moisture content in spray-dried tamarind pulp extract..... 77
37	Stability of spray-dried tamarind pulp extract from clear vial..... 78
38	Stability of spray-dried tamarind pulp extract from light protected vial..... 78
39	Percent remaining of tartaric acid in oil-in-water emulsion containing 8 % w/w spray-dried tamarind pulp extract at ambient temperature for 6 week 91
40	Mean melanin value during 6 weeks 92
41	Mean moisture value during 6 week..... 93

LIST OF ABBREVIATIONS

μg	=	microgram
μm	=	micrometer
AOAC	=	association of official analytical chemists
CV	=	coefficient of variation
DE	=	dextrose equivalents
df	=	degree of freedom
et al.	=	<i>et alii</i> , 'and others'
g	=	gram
h	=	hour
HPLC	=	high performance liquid chromatography
i.e.	=	id est
kg	=	kilogram
mg	=	milligram
min	=	minute
mL	=	milliliter
mM	=	millimolar
mm	=	millimeter
mPas	=	millipascal
No.	=	number
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celsius
R^2	=	coefficient of determination
rpm	=	revolution per minute
SD	=	standard deviation
SEM	=	scanning electron microscope
UV	=	ultraviolet
w/v	=	weight by volume
w/w	=	weight by weight