

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านคอลลาจิเนส และฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส ของสารสกัด  
มะขามป้อม ที่ปลูกในประเทศไทยสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง



นางสาว พรสุข จิตรถเวช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-1786-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**481963**

ANTIOXIDANT, ANTI-COLLAGENASE AND ANTI-TYROSINASE  
ACTIVITIES OF EXTRACTS OF *PHYLLANTHUS EMBLICA* (AMLA)  
LOCALLY GROWN IN THAILAND FOR USE IN COSMETIC PRODUCTS

Miss Ponsuk Jithavech

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 2005

ISBN 974-14-1786-1

Copyright of Chulalongkorn University



พรสุข จิตรถเวช : ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านคอลลาจีเนส และฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามป้อมที่ปลูกในประเทศไทยสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. (ANTIOXIDANT, ANTI-COLLAGENASE AND ANTI-TYROSINASE ACTIVITIES OF EXTRACTS OF *PHYLLANTHUS EMBLICA* (AMLA) LOCALLY GROWN IN THAILAND FOR USE IN COSMETIC PRODUCTS) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. อุบลทิพย์ นิรมานนิตย์, 245 หน้า. ISBN 974-14-1786-1.

มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn. พืชในวงศ์ Euphorbiaceae) ใช้เป็นอาหารและยาในประเทศแถบทวีปเอเชียมานานนับพันปี การศึกษาครั้งนี้จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายต่างชนิดกันจากผลมะขามป้อมที่ปลูกในประเทศไทย ในการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านคอลลาจีเนส และฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส โดยนำผงแห้งของสารสกัดมะขามป้อมจากการพ่นแห้งมาสกัดโดยตรงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดที่มีสภาพขั้วต่างๆกัน ได้แก่ เอธิลอะซิเตต, อะซิโตน และเอทานอล โดยใช้เครื่องสกัดชอกเลต ผงแห้งของสารสกัดมะขามป้อมที่เหลือจากการสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต ถูกนำมาสกัดอย่างต่อเนืองด้วยอะซิโตน และต่อด้วยเอทานอล ได้สารสกัดอะซิโตน (อย่างต่อเนือง) และ สารสกัดเอทานอล (อย่างต่อเนือง) ตามลำดับ สารสกัดทั้ง 5 ส่วน, สารสกัดมะขามป้อมจากการพ่นแห้งและสารสกัดมะขามป้อมทางการคั่วถูกนำมาประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากคุณสมบัติการให้ไฮโดรเจนอะตอมและการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลแม้ว่าสารสกัดอะซิโตน(โดยตรง) เอทานอล (โดยตรง) เอทานอล(อย่างต่อเนือง) อะซิโตน(อย่างต่อเนือง) และสารสกัดมะขามป้อมพ่นแห้ง ( $IC_{50} = 4.43, 4.62, 4.63, 5.00$  และ  $6.29 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ) มีฤทธิ์ในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระดีพีพีเอชน้อยกว่าอีจีจีจี วิตามินซีและโทรอกซ์ แต่ก็ยังมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดมะขามป้อมทางการคั่ว ( $IC_{50} = 6.87 \mu\text{g/mL}$ ) ส่วนสารสกัดเอธิลอะซิเตตมีฤทธิ์ในการให้ไฮโดรเจนอะตอมต่ำที่สุด โดยแสดงค่า  $IC_{50}$  สูงที่สุดเท่ากับ  $7.74 \mu\text{g/mL}$  สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลนั้นสารสกัดอะซิโตน (อย่างต่อเนือง) ( $IC_{50} = 0.88 \text{ mg/mL}$ ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุดและใกล้เคียงกับโทรอกซ์ ( $IC_{50} = 0.92 \text{ mg/mL}$ ) ในขณะที่สารสกัดจากมะขามป้อมพ่นแห้ง ( $IC_{50} = 1.12 \text{ mg/mL}$ ) และอีจีจีจี ( $IC_{50} = 1.19 \text{ mg/mL}$ ) ให้ฤทธิ์น้อยกว่าสารสองชนิดแรกแต่ยังคงมีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดมะขามป้อมทางการคั่ว ( $IC_{50} = 1.62 \text{ mg/mL}$ ) และสารสกัดอะซิโตน(โดยตรง) ( $IC_{50} = 1.67 \text{ mg/mL}$ ) พบว่าสารสกัดมะขามป้อมทั้งหมดที่ความเข้มข้นต่ำมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันต่อการสลายตัวของดีออกซีไรโบส แต่อย่างไรก็ตามพบว่าฤทธิ์ในการกระตุ้นออกซิเดชันนี้ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น และพบว่าสารสกัดอะซิโตน (อย่างต่อเนือง) ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นออกซิเดชันที่ความเข้มข้นสูงกว่า  $1 \text{ mg/mL}$  ในขณะที่สารสกัดมะขามป้อมอื่นๆและ อีจีจีจียังคงแสดงฤทธิ์กระตุ้นออกซิเดชัน พบว่าทั้งสารสกัดเอทานอล (อย่างต่อเนือง, โดยตรง) และสารสกัดอะซิโตน (อย่างต่อเนือง, โดยตรง) มีฤทธิ์ต้านคอลลาจีเนสมากกว่าสารสกัดมะขามป้อมอื่นๆ ในขณะที่สารสกัดมะขามป้อมทางการคั่วมีฤทธิ์ต้านคอลลาจีเนสต่ำที่สุด ฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามป้อมในการป้องกันการสร้างเมลานิน พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตให้ฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสมากที่สุดซึ่งส่งผลให้สารสกัดโดยตรงของทั้งอะซิโตนและเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสมากกว่าสารสกัดอย่างต่อเนือง นอกจากนี้พบว่าสารสกัดมะขามป้อมทั้งหมดมีความคงตัวดีในการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในช่วงการเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 เดือน จากข้อมูลการศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่ามะขามป้อมที่ปลูกในประเทศไทยสามารถช่วยป้องกันผิวหนังจากการทำลายของอนุมูลอิสระ, ทั้งยังป้องกันผิวหนังจากเอนไซม์คอลลาจีเนสและเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้นด้วยคุณสมบัติมากมายของสารสกัดมะขามป้อม สารสกัดมะขามป้อมจึงเป็นประโยชน์มากต่อการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อสุขภาพ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีสารสนเทศ.....

ปีการศึกษา.....2548.....

ลายมือชื่อนิติ.....พรสุข จิตรถเวช.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....นาย ธีระวัฒน์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....นาย ธีระวัฒน์.....

## 4776852733 : MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (INTERNATIONAL) PROGRAM  
 KEYWORD : *PHYLLANTHUS EMBLICA*/ ANTIOXIDANT/ ANTI-COLLAGENASE/ ANTI-TYROSINASE/ FRUIT EXTRACT

PONSUK JITHAVECH: ANTIOXIDANT, ANTI-COLLAGENASE AND ANTI-TYROSINASE ACTIVITIES OF EXTRACTS OF *PHYLLANTHUS EMBLICA* (AMLA) LOCALLY GROWN IN THAILAND FOR USE IN COSMETIC PRODUCTS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. UBONTHIP NIMMANNIT, Ph.D. 245 p.p. ISBN 974-14-1786-1.

Ma-kham-pom (*Phyllanthus emblica* Linn., family Euphorbiaceae) has been used for thousands of years in food and medicine in Asian countries. The objective of this study was to evaluate different solvent extracts of *P. emblica* fruits, locally grown in Thailand for their antioxidant, anti-collagenase and anti-tyrosinase activities. Spray-dried powder of *P. emblica* was directly and separately extracted with three solvents of different polarities, i.e. ethyl acetate, acetone and ethanol using a Soxhlet extractor. After ethyl acetate extraction, the remaining spray-dried powder was also successively extracted with acetone and then ethanol to yield acetone (successive) and ethanol (successive) extracts, respectively. The five extracts plus the spray-dried and commercial *P. emblica* were evaluated for their H-donating and hydroxyl radical scavenging activities. All the *P. emblica* extracts showed H-donating activity on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) radical. The DPPH-scavenging activity of acetone (direct), ethanol (direct), ethanol (successive), acetone (successive) extracts and spray-dried *P. emblica* ( $IC_{50}$  = 4.43, 4.62, 4.63, 5.00 and 6.29  $\mu\text{g/mL}$ , respectively), although lower than EGCG, l-ascorbic acid and Trolox<sup>®</sup>, was still greater than the commercial *P. emblica* extract (6.87  $\mu\text{g/mL}$ ). Ethyl acetate extract exhibited the lowest H-donating activity with the highest  $IC_{50}$  of 7.74  $\mu\text{g/mL}$ . Regarding the hydroxyl radical scavenging activity, the acetone (successive) extract ( $IC_{50}$  0.88 mg/mL) exhibited the highest potency comparable to Trolox<sup>®</sup> ( $IC_{50}$  0.92 mg/mL), whereas spray-dried *P. emblica* ( $IC_{50}$  1.12 mg/mL) and EGCG ( $IC_{50}$  1.19 mg/mL) had an activity slightly less than the first two components but greater than the commercial *P. emblica* extract ( $IC_{50}$  1.62 mg/mL) and the acetone (direct) extract ( $IC_{50}$  1.67 mg/mL). At lower concentrations, pro-oxidant activity was observed for all *P. emblica* extracts based on deoxyribose degradation. However, their pro-oxidant effect decreased at higher concentrations. The acetone (successive) extract was completely free from pro-oxidant activity at concentration above 1mg/mL, whereas other *P. emblica* extracts and EGCG still showed some pro-oxidant activity. Both the ethanol (successive, direct) and acetone (successive, direct) extracts possessed more potent anti-collagenase activity than other *P. emblica* extracts, whereas the commercial *P. emblica* extract exhibited the lowest anti-collagenase activity. Anti-tyrosinase activity of *P. emblica* was also evaluated for its protective effect on melanogenesis. The ethyl acetate extract was found to give the highest tyrosinase inhibitory activity and, thus, both the direct acetone and ethanol extracts provided more potent anti-tyrosinase activity than the successive extracts. Moreover, all of the extracts exhibited good long-term stability with respect to the DPPH-scavenging activity during 9-month storage at ambient temperature. These results thus suggested that *P. emblica* locally grown in Thailand was capable of helping protect the skin from damaging effects caused by free radicals, as well as from the collagenase and tyrosinase enzymes. Therefore, the multifunctional effects of *P. emblica* extracts may have a strong potential for uses in cosmetic and other health-related industries.

Field of study..Pharmaceutical Technology.. Student's signature.. Ponsuk..... Jithavech...

Academic year..... 2005..... Advisor's signature.. Parkpoom Tengamnuay

Co-advisor's signature Ubonthip Nimmannit

## ACKNOWLEDGEMENTS

The success of my thesis would not be realized without the support and assistance of many people who have made their kind contributions to the study.

First of all, I would like to express my profound gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Parkpoom Tengamnuy, for his excellent advice, valuable guidance and continual support during the entire duration of the work.

I would like to express my sincere appreciation to Associate Professor Dr. Ubonthip Nimmannit, my thesis co-advisor, for her warm support, kindness and encouragement.

Special thanks to the thesis committee for their constructive suggestions and invaluable comments. Furthermore, I am most grateful for the in depth reviews that precede the completion of this thesis.

I would like to thank Associate Professor Dr. Rapepol Bavovada of the Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for his kindness providing spray-dried *Phyllanthus emblica* powder and helpful guidance in *P. emblica* extraction.

Thank are also extended to DSM Nutritional Product Co. Ltd., and Merck, Ltd., for supporting l-ascorbic acid and commercial *P. emblica* extract needed in conducting in this study.

I also thank all staff members of the Pharmaceutical Research Instrument Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for facilitating instruments and work area in the study.

I thank my friends for their help and encouragement. My sincere appreciation goes to Ms. Kanjana Wachiranuntasin, for her kind technical guidance, and valuable advice.

Finally, I would like to express my deepest gratitude and infinite thankfulness to my family for their endless love, understanding and encouragement that greatly support me in order to make this thesis possible.

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURES REVIEW.....	7
1. Skin and skin aging .....	7
2. Biological homeostasis.....	22
3. Photodamage.....	28
4. Theory of oxidative stress and reactive species.....	29
5. Theory of extrinsic aging.....	40
6. Theory of hyperpigmentation.....	45
7. Skin care products.....	50
8. Review of <i>Phyllanthus emblica</i> Linn.....	65
III. MATERIALS AND METHODS.....	79
Crude drugs.....	79
Materials.....	79
Reference antioxidants.....	80
Reference anti-collagenase.....	80
Reference anti-tyrosinase.....	80
Apparatus.....	80
Methods.....	82
IV. RESULTS AND DISSCUSSION.....	108
1. Preparation of crude extracts from fruit juice of <i>Phyllanthus emblica</i> locally grown in Thailand.....	108

2. Evaluation of different <i>Phyllanthus emblica</i> extracts for antioxidant activities.....	111
2.1 Hydrogen-donating activity (DPPH radical scavenging activity) .....	111
2.2 Hydroxyl radical scavenging activity.....	124
2.3 Pro-oxidant activity.....	137
3. Evaluation of different <i>Phyllanthus emblica</i> extracts for anti-collagenase activity.....	150
4. Evaluation of different <i>Phyllanthus emblica</i> extracts for anti-tyrosinase activity.....	164
5. Preliminary stability evaluation of <i>Phyllanthus emblica</i> extracts.....	176
V. CONCLUSIONS.....	183
REFERENCES.....	190
APPENDICES.....	204
Appendix A.....	205
Appendix B.....	211
Appendix C.....	216
Appendix D.....	229
Appendix E.....	237
Appendix F.....	242
VITA.....	245



## LIST OF TABLES

Table		Page
1	Selected MMPs with known substrates.....	17
2	Determinants of antioxidant status in humans.....	23
3	Defense systems <i>in vivo</i> against oxidative damage.....	27
4	Reactive oxygen and nitrogen species of biological interest.....	33
5	Chemical constituents reported from <i>Phyllanthus emblica</i> L.....	69
6	The initial and final concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ) of the test sample.....	88
7	Reaction mixture (final volume of 1.0 mL) for hydroxyl scavenging activity.....	94
8	Reaction mixture (final volume of 1.0 mL) for pro-oxidant activity.....	98
9	The extraction of spray-dried powder of <i>P. emblica</i> .....	109
10	DPPH radical inhibition of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> compared to other antioxidants at different concentrations (Mean $\pm$ SD, n= 3).....	114
11	The IC <sub>50</sub> values for DPPH radical scavenging activity of each antioxidant. The R <sup>2</sup> is the regression coefficient obtained from polynomial regression of the rising portion of the plot between the inhibition percentage and the concentration of each antioxidant (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	120
12	Hydroxyl radical inhibition of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> compared to other antioxidants at different concentrations (Mean $\pm$ SD, n= 3).....	128
13	The IC <sub>50</sub> value for hydroxyl radical scavenging activity of each antioxidant. The R <sup>2</sup> is the regression coefficient obtained from polynomial regression of the partial of the plot between the inhibition percentage and the concentration of each antioxidant (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	133

<b>Table</b>	<b>Page</b>
14 The absorbance and normalized pro-oxidant activity relative to the ascorbic acid-free control (0 mg/mL sample) of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> and other antioxidants at different concentrations, in comparison with ascorbic acid reference standard (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	142
15 The absorbance and significant level of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> and other antioxidants at different concentrations in comparison with ascorbic acid-free control (0 mg/mL sample) and ascorbic acid reference standard (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	145
16 Percent of collagenase inhibition by various concentrations of 1,10-phenanthroline at different time periods (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	151
17 Collagenase inhibition of spray-dried <i>P. emblica</i> , its various solvent extracts and the commercial extract at various concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	154
18 The IC <sub>50</sub> values for anti-collagenase activity of individual inhibitors. The R <sup>2</sup> is the regression coefficient obtained from polynomial regression of the partial of the plot between the inhibition percentage and the concentration of each inhibitor (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	160
19 Tyrosinase inhibition of spray-dried <i>P. emblica</i> and its various solvent extracts compared to commercial extract and licorice extract at various concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	167
20 The IC <sub>50</sub> values for anti-tyrosinase activity of the individual inhibitors. The R <sup>2</sup> is the regression coefficient obtained from polynomial regression of the partial of the plot between the inhibition percentage and the concentration of each inhibitor (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	173
21 Stability of spray-dried <i>P. emblica</i> , various solvent extracts of <i>P. emblica</i> and commercial <i>P. emblica</i> extract as determined from % DPPH inhibitory activity (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	178
22 Stability of spray-dried <i>P. emblica</i> , various solvent extracts of <i>P. emblica</i> and commercial <i>P. emblica</i> extract as determined from % DPPH inhibitory activity relative to their initial value (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	178

<b>Table</b>	<b>Page</b>
23	Summary of antioxidant, anti-collagenase and anti-tyrosinase activities (expressed as average IC <sub>50</sub> values) of the individual test samples..... 188

## LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Basic skin structure.....	8
2	Balance system between oxidative stress and defense system .....	24
3	Antioxidant enzymes and their reaction mechanisms.....	25
4	Interaction network of nonenzymatic antioxidants.....	26
5	A summary of the biological pathways involved in the free radical/ oxidative stress theory of aging.....	45
6	Diagram showing melanogenesis as a result of a complex set of regulatory processes involving direct effects of UV radiation on melanocytes and indirect effects through the release of keratinocyte- derived factors.....	46
7	Melanogenesis pathway.....	48
8	A reasonable model for the active site of mammalian tyrosinase enzyme.....	49
9	Vitamin E structure. Molecular structures of 4 tocopherols and 4 trocotrienol comprising vitamin E. Substitution of methyl groups (CH <sub>3</sub> ) at positions R <sub>1</sub> and R <sub>2</sub> determine whether the molecules are $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - and $\delta$ -.....	55
10	Structure of vitamin C, Trolox <sup>®</sup> and EGCG.....	58
11	Chemical structure of hydroquinone, arbutin, kojic acid, stilbene skeleton and glabridin.....	64
12	<i>Phyllanthus emblica</i> L.....	68
13	Diagram of the extraction process of <i>P. emblica</i> fruits.....	83
14	Soxhlet extractor.....	84
15	Structure of DPPH and reaction with an antioxidant.....	87
16	Soxhlet extractor and evaporator.....	109
17	Spray-dried <i>P. emblica</i> powder.....	110
18	Five fractions of <i>P. emblica</i> : ethyl acetate, acetone (successive), acetone (direct), ethanol (successive) and ethanol (direct) extracts.....	110

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
19 DPPH radical inhibition of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> compared to commercial <i>P. emblica</i> extract and other antioxidants at different concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	112
20 Relationship between percent DPPH radical inhibition and the concentration of the individual antioxidants (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	115-116
21 The relation of the % DPPH inhibition-concentration profile of the individual antioxidants. The polynomial regression equation for determining the IC <sub>50</sub> and the regression coefficient (R <sup>2</sup> ) are also provided for the individual antioxidants.....	117-119
22 The IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) of each antioxidant for DPPH radical inhibition (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	121
23 The extent of hydroxyl radical inhibition of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> in comparison with other antioxidants at different concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	126
24 Relationship between hydroxyl radical inhibition extent and concentration of antioxidants (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	129
25 The relation of the % hydroxyl radical inhibition-concentration profile of the individual antioxidants. The polynomial regression equation for determining the IC <sub>50</sub> and the regression coefficient (R <sup>2</sup> ) are also provided for the individual antioxidants.....	130-132
26 The IC <sub>50</sub> (mg/mL) of each antioxidant for hydroxyl radical inhibition (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	135
27 The extent of pro-oxidant activity of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> in comparison with other antioxidants at different concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	139
28 Relationship between the absorbance at 532 nm (pro-oxidant effect) and the concentration of the individual antioxidants (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	140-141

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
29 The absorbance of various solvent extracts of <i>P. emblica</i> and other antioxidants in the range of 1.00-3.00 mg/mL compared to their respective ascorbic acid-free controls and ascorbic acid reference standard (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	146
30 The absorbance of Trolox <sup>®</sup> at various concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	148
31 Percent of collagenase inhibition at different times of various concentrations of 1,10-phenanthroline (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	152
32 The extent of % collagenase inhibition of spray-dried <i>P. emblica</i> and its various solvent extracts compared to commercial extract at various concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	152
33 The relationship between percent collagenase inhibition and the concentration of the collagenase inhibitors (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	155
34 The relationship between percent collagenase inhibition and concentration of the individual inhibitors. The polynomial regression equation for determining the IC <sub>50</sub> and the regression coefficient (R <sup>2</sup> ) are also provided for the individual collagenase inhibitors.....	158-159
35 The IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) of each collagenase inhibitor (Mean $\pm$ SD, n = 3)....	161
36 The extent of % tyrosinase inhibition of spray-dried <i>P. emblica</i> and its various solvent extracts compared to commercial extract and licorice extract at various concentrations (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	166
37 The relationship between percent tyrosinase inhibition and the concentration of the individual tyrosinase inhibitors (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	168
38 The relationship between percent tyrosinase inhibition and concentration of the individual inhibitors. The polynomial regression equation for determining the IC <sub>50</sub> and the regression coefficient (R <sup>2</sup> ) are also provided for the individual tyrosinase inhibitors.....	171-172
39 The IC <sub>50</sub> (mg/mL) of each tyrosinase inhibitor (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	174

<b>Figure</b>		<b>Page</b>
40	Percent DPPH inhibitory activity (prepared at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after storage up to 9 months (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	179
41	Percent DPPH inhibitory activity (prepared at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after storage up to 9 months (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	179
42	Percent DPPH inhibitory activity of each antioxidant after storage up to 9 months (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	180
43	Percent DPPH inhibitory activity relative to initial value (prepared at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after storage up to 9 months (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	181
44	Percent DPPH inhibitory activity relative to initial value (prepared at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after storage up to 9 months (Mean $\pm$ SD, n = 3).....	181

## LIST OF ABBREVIATIONS

abs	=	absorbance
ACTH	=	adrenocorticotrophic hormone
ANOVA	=	analysis of variance
°C	=	degree Celcius
Ca	=	calcium
conc.	=	concentration
Cu	=	copper
D.I.	=	de-ionized
DPPH	=	1,1-diphenyl-2-picrylhadrazine
Fe <sup>3+</sup>	=	ferric ion
Fe <sup>2+</sup>	=	ferrous ion
g	=	gram
H <sub>2</sub> O	=	water
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	hydrogen peroxide
OH·	=	hydroxyl radical
hr	=	hour
IC <sub>50</sub>	=	median inhibitory concentration
µg	=	microgram
µL	=	microliter
µM	=	micromolar
MSH	=	melanocyte stimulating hormone
mg	=	milligram
mL	=	milliliter
mM	=	millimolar
MMPs	=	matrix metalloproteinases
min	=	minute
M.W.	=	molecular weight
nm	=	nanometer
no.	=	number
PG	=	propylene glycol



PGE <sub>2</sub>	=	prostaglandins E-2
R <sup>2</sup>	=	regression coefficient
ROS	=	reactive oxygen species
RNS	=	reactive nitrogen species
rpm	=	revolution per minute
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	=	singlet oxygen
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	=	sodium phosphate monobasic
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	=	sodium phosphate dibasic
SD	=	standard deviation
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	=	superoxide anion
SOD	=	superoxide dismutase
TIMPs	=	tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
UV	=	ultraviolet
w/v	=	weight by volume
w/w	=	weight by weight
wk	=	week
Zn	=	zinc