

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47211

DEVELOPMENT OF WRINKLE REDUCING SERUM  
CONTAINING NATURAL ANTIOXIDANT

POONRATANA LEERAPAN

MASTER OF SCIENCE  
IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY

SEPTEMBER 2011

60.51106

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47211

**DEVELOPMENT OF WRINKLE REDUCING SERUM  
CONTAINING NATURAL ANTIOXIDANT**



**POONRATANA LEERAPUN**

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN  
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
IN PHARMACEUTICAL SCIENCES**

**THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY**

**SEPTEMBER 2011**

**DEVELOPMENT OF WRINKLE REDUCING SERUM  
CONTAINING NATURAL ANTIOXIDANT**

POONRATANA LEERAPUN

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED  
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

**EXAMINING COMMITTEE**

*Nantarit Chokethaworn*.....CHAIRPERSON  
Asst.Prof. Dr. Nantarit Chokethaworn

*Pimporn Leelapornpisid*.....MEMBER  
Assoc.Prof. Pimporn Leelapornpisid

*Ampai Phrutivorapongkul*.....MEMBER  
Asst.Prof. Dr. Ampai Phrutivorapongkul

**THESIS ADVISORY COMMITTEE**

*Pimporn Leelapornpisid*.....ADVISOR  
Assoc.Prof. Pimporn Leelapornpisid

*Ampai Phrutivorapongkul*.....CO-ADVISOR  
Asst.Prof. Dr. Ampai Phrutivorapongkul

19 September 2011

© Copyright by Chiang Mai University

## ACKNOWLEDGEMENT

First of all, I would like to express my appreciation to my advisor and co-advisor, Assoc.Prof. Pimporn Leelapornpisid and Asst.Prof. Dr. Ampai Phrutivorapongkul, who have benignantly provided encouragements, guidances and assistances all along this thesis. I would like to thank Asst.Prof. Dr. Nantarit Chokethaworn for being an examining chairperson and giving many advices, thank Prof. Dr. R. Randall Wickett for kindly giving the beneficial suggestions, and thank to Dr. Nasapon Povichit and Dr. Moses Z. Zaruwa for helpful guidance and friendly assistances.

The grateful acknowledgements are also extended to the Thailand Research Fund – Master Research Grants (TRF-MAG) for financial support, to the Rubia Industries Limited for supporting some test materials, and to the Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University for distributing opportunity to study in the program of Master Degree of Pharmaceutical Sciences.

Eventually, I sincerely thank to my parents, my teachers and all my friends for their good intentions throughout this study.

Poonratana Leerapun

**Thesis Title**            Development of Wrinkle Reducing Serum Containing Natural Antioxidant

**Author**                 Mr. Poonratana Leerapun

**Degree**                 Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc.Prof. Pimporn Leelapornpisid	Advisor
Asst.Prof. Dr. Ampai Phrutivorapongkul	Co-advisor

**ABSTRACT**

**E47211**

Nowadays, natural cosmeceutical markets are progressively expanded especially the anti-wrinkle products. As many studies have showed that natural antioxidants enable to reduce and prevent from wrinkle formation, a large number of natural extracts are commercially used and claimed to provide these effects. However, some of them still have not enough scientific evidences. This study purposed to investigate some of these commercially claimed extracts for their antioxidant activities, and to select the most proper for developing into anti-wrinkle serum.

The commercial extracts of this study were including French maritime pine bark (PBE), red wine (RWE), grape seed (GSE), pomegranate (PME), soy bean (SYE), and dulse algae (DSE) extracts. According to antioxidant activity studies, PBE, RWE and GSE exhibited high activities for both DPPH and TBARS methods while the others

showed low activities. From TLC chromatograms, those three extracts had contained the same compound which was procyanidin whereas GSE also composed of  $\alpha$ -tocopherol and two more antioxidants. After incorporated into serum base, all products (i.e. serum base, PBE serum, RWE serum and GSE serum) were stable throughout six cycles of heating-cooling accelerated test. Since PBE serum and RWE serum presented unpleasant dark color, and RWE serum showed slightly irritation from rabbit skin primary irritation study, thus GSE serum with better appearance was more appropriate for cosmetic application. GSE serum also performed higher antioxidant activities than serum base ( $p < 0.05$ ). According to the clinical studies, no skin irritation or allergic reaction occurred in GSE serum and serum base. The wrinkle reducing capacity was evaluated after 6 weeks of twice daily application. GSE serum significantly reduced forearm wrinkle comparing to baseline ( $p < 0.01$ ). The efficiency of GSE serum was higher than serum base, especially significantly in the volume parameter ( $p < 0.05$ ). These results implied that GSE serum had the higher effect on filling the bottom of the wrinkles owing to antioxidants consisting in GSE. The grape seed extract with skin compatibility and good wrinkle reducing capacity can be used as an active substance in natural anti-wrinkle cosmetics.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์      การพัฒนาซีรัมลดริ้วรอยที่ผสมสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ผู้เขียน                      นายพูนรัตน์ ธีรพันธุ์

ปริญญา                      วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. พิมพ์	กิตาพรพิสิฐ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. อ่ำไพ	พฤติวรพงศ์กุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

**E47211**

ในปัจจุบันนี้ ตลาดเวชสำอางธรรมชาติได้ขยายตัวอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในกลุ่มผลิตภัณฑ์ลดริ้วรอยหรือชะลอวัย มีการศึกษามากมายที่แสดงถึงสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติสามารถลดและปกป้องการเกิดริ้วรอยได้ ทำให้สารสกัดธรรมชาติจำนวนมากถูกนำมาใช้ทางพาณิชย์และอ้างถึงสรรพคุณดังกล่าว อย่างไรก็ตามสารสกัดที่มีจำหน่ายบางส่วนยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เพียงพอ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดบางส่วนที่มีการอ้างถึงฤทธิ์ดังกล่าวและคัดเลือกเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ซีรัมลดริ้วรอย

สารสกัดที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ สารสกัดเปลือกสน French maritime สารสกัดไวน์แดง สารสกัดเมล็ดองุ่น สารสกัดทับทิม สารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดสาหร่ายทะเล dulce จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า สารสกัดเปลือกสน สารสกัดไวน์แดง และสารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์สูงทั้งวิธี DPPH และวิธีทดสอบ TBARS ขณะที่สารสกัดที่เหลืองมีฤทธิ์ต่ำ จากการศึกษาด้วยโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง พบว่าสารสกัดทั้งสามชนิดดังกล่าวมีสารสำคัญเดียวกันคือ procyanidin แต่ในสารสกัดเมล็ดองุ่นยังพบ alpha-tocopherol และสารอื่นอีกสองชนิดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวผสมในซีรัมตำรับพื้น ผลิตภัณฑ์ทั้งหมดมีความคงตัวหลังจากผ่านการทดสอบด้วยวัฏจักรร้อน-เย็น จำนวน 6 วัฏจักร แต่เนื่องจากซีรัมผสมสารสกัดเปลือกสนและซีรัมผสมสารสกัดไวน์แดงมีสีเข้ม และพบการระคายเคืองเล็กน้อยจากซีรัมผสมสารสกัดไวน์แดงจากการทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นในผิวหนังกระต่าย ทำให้ซีรัมผสมสารสกัดเมล็ด

องุ่นซึ่งมีรูปลักษณะที่คิดว่ามีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ทางเครื่องสำอาง พบว่าซีรัมผสมสารสกัดเมล็ดองุ่นให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงกว่าซีรัมตำรับพื้น ( $p < 0.05$ ) จากการศึกษาในอาสาสมัคร ไม่พบอาการระคายเคืองหรืออาการแพ้ที่เกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์ทั้งซีรัมผสมสารสกัดเมล็ดองุ่นและซีรัมตำรับพื้น และจากการทดสอบประสิทธิภาพการลดริ้วรอยหลังการทาผลิตภัณฑ์ทดสอบวันละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ซีรัมผสมสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถลดริ้วรอยบริเวณท้องแขนได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังการใช้ ( $p < 0.01$ ) และประสิทธิภาพการลดริ้วรอยของซีรัมผสมสารสกัดเมล็ดองุ่นสูงกว่าซีรัมตำรับพื้น และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญในตัวแปรปริมาตรของน้ำที่ใช้ในการเติมช่องว่างของร่องริ้วรอย ( $p < 0.05$ ) จากผลการทดสอบดังกล่าวชี้ว่า ซีรัมผสมสารสกัดเมล็ดองุ่นมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าในการเติมเต็มร่องริ้วรอยซึ่งมาจากสารต้านอนุมูลอิสระที่ประกอบในสารสกัดเมล็ดองุ่น ดังนั้นสารสกัดเมล็ดองุ่นซึ่งไม่ก่อการระคายเคืองและมีประสิทธิภาพในการลดริ้วรอย จึงเป็นสารสกัดที่สามารถนำมาใช้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางลดริ้วรอยจากธรรมชาติ

**TABLE OF CONTENTS**

	<b>Page</b>
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ENGLISH ABSTRACT	iv
THAI ABSTRACT	vi
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiv
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xvii
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 The objectives of study	2
CHAPTER 2 LITERATURE REVIEWS	3
2.1 Skin and skin structure	3
2.1.1 Skin functions	3
2.1.2 Skin structure	4
2.2 Skin aging	8
2.2.1 Type of skin aging	10
2.2.2 Theory of aging	10
2.2.3 Free radicals and skin aging	12
2.3 Natural antioxidants preventing skin aging	17
2.3.1 Grape and grape products	18
2.3.2 French maritime pine bark	19

2.3.3 Soy bean	19
2.3.4 Pomegranate	20
2.3.5 Marine algae (Seaweeds)	20
2.4 Testing Methodologies	23
2.4.1 <i>In vitro</i> methods to determine antioxidant activities	23
2.4.2 Clinical test of anti-wrinkle products	26
2.5 Cosmetic serum	29
<b>CHAPTER 3 MATERIALS AND METHODS</b>	<b>30</b>
3.1 Chemicals	30
3.2 Natural extracts	31
3.3 Instruments	31
3.4 Determination of antioxidation activities	32
3.4.1 DPPH radical scavenging method	33
3.4.2 TBA-reactive substances (TBARS) method	33
3.5 TLC chromatograms of selected extracts	34
3.6 Solubility of selected extracts	34
3.7 Stability of selected extracts	35
3.8 Development of serum base	35
3.8.1 Formulation of serum base	35
3.8.2 Stability test of selected serum base	36
3.9 Development of active serum	36
3.9.1 Formulation of active serum	36
3.9.2 Rabbit skin primary irritation test	36
3.9.3 Selection of active serum	38

3.10 Stability and antioxidant activities of active serum	38
3.10.1 Stability test of active serum	38
3.10.2 Antioxidant test of active serum	38
3.11 Skin compatibility test of active serum in human volunteers	39
3.11.1 Study population	39
3.11.2 Test materials	40
3.11.3 Test method	40
3.12 Performance test of wrinkle reducing capacity of active serum	41
3.12.1 Study population	41
3.12.2 Test method	41
3.12.3 Satisfaction on test serums	44
<b>CHAPTER 4 RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>45</b>
4.1 Determination of antioxidation activities	45
4.1.1 DPPH radical scavenging method	45
4.1.2 TBA-reactive substances (TBARS) method	45
4.2 TLC chromatograms of selected extracts	47
4.3 Solubility of selected extracts	50
4.4 Stability of selected extracts	52
4.5 Development of serum base	54
4.5.1 Formulation of serum base	54
4.5.2 Stability test of selected serum base	55
4.6 Development of active serum	55
4.6.1 Formulation of active serum	55
4.6.2 Rabbit skin primary irritation test	57

4.6.3 Selection of active serum	59
4.7 Stability and antioxidant activities of active serum	59
4.7.1 Stability test of active serum	59
4.7.2 Antioxidant test of active serum	62
4.8 Skin compatibility test of active serum in human volunteers	64
4.9 Performance test of wrinkle reducing capacity of active serum	66
CHAPTER 5 CONCLUSION	75
REFERENCES	77
APPENDICES	87
APPENDIX A Information sheet	88
APPENDIX B Informed consent sheet	93
APPENDIX C Satisfaction questionnaire	95
APPENDIX D Measured values of the volunteers	97
CURRICULUM VITAE	101

**LIST OF TABLES**

<b>Table</b>	<b>Page</b>
2.1 Summary of Aging Theories	11
2.2 Type of free radicals associating with biology	13
3.1 The descriptive terms of solubility	34
3.2 Draize scoring system	37
3.3 Classification of skin irritation	38
3.4 The application orders for clinical study	43
4.1 Antioxidant activities of natural extracts and standards	46
4.2 Solubility of selected extracts at ratio of 30:1	52
4.3 Antioxidant activity (DPPH method) of selected extracts at before and after six cycles of heating-cooling cycling	52
4.4 Physical appearances of all serum base formulations	54
4.5 Physical appearances of active formulations and their serum base	56
4.6 Altering on physical properties of serums after heating-cooling cycling	56
4.7 Primary irritation index (PII) and skin irritation reaction in rabbits	58
4.8 The chemical and physical properties of serum base and GSE serum after stability test	61
4.9 Primary irritation index (PII) and skin irritation reaction in 32 volunteers	65
4.10 Wrinkle reducing capacity after 6 weeks of treatments	66

4.11 % Efficiency on wrinkle reducing capacity after 6 weeks of treatments	69
4.12 The percentage of satisfaction on GSE serum	73
4.13 The percentage of satisfaction on serum base	74

**LIST OF FIGURES**

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
2.1 Structure and layers of skin	4
2.2 Sections of skin epidermis	5
2.3 Components of skin dermis	6
2.4 Fibroblast and its metabolism	7
2.5 Schematic drawing of young and old skin	9
2.6 Role of ROS on cell surface receptors via three transduction pathways	16
2.7 Chemical structure of Procyanidins	21
2.8 Chemical structure of Resveratrol	21
2.9 Chemical structure of Genistein	22
2.10 Chemical structure of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	22
2.11 Chemical structure of Punicalagin	22
2.12 Chemical structure of DPPH <sup>·</sup> radical	24
2.13 Pathways of lipid peroxidation	25
2.14 Volume parameter	27
2.15 Ra parameter	28
2.16 Rz parameter	28
3.1 Sequence of application on skin compatibility test	40
3.2 The test sites of clinical study	42

4.1 TLC chromatograms of selected extracts and standards	48
4.2 TLC chromatograms of GSE and alpha-tocopherol	49
4.3 Solubility test of pine bark extract	51
4.4 Solubility test of red wine extract	51
4.5 Solubility test of grape seed extract	51
4.6 % Inhibition of PBE at before & after H/C cycling	53
4.7 % Inhibition of RWE at before & after H/C cycling	53
4.8 % Inhibition of GSE at before & after H/C cycling	53
4.9 Active formulations and their serum base	55
4.10 Visually physical change after heating-cooling cycling	57
4.11 Rabbit skin primary irritation reaction of test serums	58
4.12 Stability test of serum base	60
4.13 Stability test of grape seed extract (GSE) serum	60
4.14 Viscosity of serum base & GSE serum	62
4.15 % Inhibition of serum base and GSE serum on DPPH method	63
4.16 % Inhibition of serum base and GSE serum on TBARS method	63
4.17 Skin compatibility test of GSE serum and serum base in 32 volunteers	65
4.18 Mean values on surface at before and after applications	67
4.19 Mean values on volume at before and after applications	67
4.20 Mean values on Ra at before and after applications	68
4.21 Mean values on Rz at before and after applications	68
4.22 % Efficiency on surface parameter after 6 weeks of treatments	70

4.23 % Efficiency on volume parameter after 6 weeks of treatments	70
4.24 % Efficiency on Ra parameter after 6 weeks of treatments	71
4.25 % Efficiency on Rz parameter after 6 weeks of treatments	71
4.26 The forearm skin texture using Skin-Visiometer SV 600 FW at before and after three treatments	72

**ABBREVIATIONS AND SYMBOLS**

AP-1	activator protein-1
BHT	butylated hydroxytoluene
CR	cytokine receptors
DI water	deionized water
DPPH	2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSE	dulse algae extract
EGCG	epigallocatechin-3-gallate
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GFR	growth factor receptors
GSE	grape seed extract
H/C	heating-cooling
hr	hour
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration
IL-1	interleukin-1
I $\kappa$ B	inhibitor kappa B
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal kinase
kDa	kiloDalton
M	molar, molarity (mole per liter)
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MDA	malondialdehyde
mg	milligram

min	minute
ml	milliliter
mm <sup>2</sup>	square millimeter
mm <sup>3</sup>	cubic millimeter
MMPs	matrix metalloproteinase enzymes
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
nm	nanometer
OPC	oligomeric procyanidin
<i>p</i> -value	probability value
Pa	Pascal
PBE	French maritime pine bark extract
PEG-400	polyethylene glycol-400
pH	power of hydronium ion
PI3K	phosphoinositide-3 kinase
PII	primary irritation index
PME	pomegranate extract
PUFA	polyunsaturated fatty acids
Ra	arithmetic roughness
$R_f$	retention factor
ROS	reactive oxygen species
rpm	round per minute
RS	resveratrol
RT	room temperature

RWE	red wine extract
Rz	average roughness
SBE	Smad binding element
SLS	sodium lauryl sulfate
SYE	soy bean extract
TBA	thiobarbituric acid
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances
TGF- $\beta$	transforming growth factor-beta
TLC	thin-layer chromatography
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
UV	ultraviolet
$\alpha$	alpha
$\alpha$ -E	alpha-tocopherol
$\beta$	beta
$\kappa$	kappa
$\mu$ M	micromolar
$^{\circ}$ C	degree Celsius
%	percent
% v/v	volume by volume percent
% w/v	weight by volume percent
<	less than
$\pm$	plus-minus sign