

การตั้งสูตรตำรับ การแสดงลักษณะเฉพาะและการเข้าสู่ อีซีวี-304 เซลล์แบบนอกราย
ของโซลิดลิพิดนาโนพาร์ทิเคิลที่บรรจุสารสกัดบัวบก

นายนิพนธ์ แจงเจริญกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 6 5 7 4 3 3 3

**FORMULATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO
UPTAKE INTO ECV-304 CELL OF SOLID LIPID
NANOPARTICLES CONTAINING
CENTELLA ASIATICA
EXTRACTS**

Mr. Niphan Ngaechoenkul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy
Department of Manufacturing Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University

502116

นิพนธ์ แจ้เจริญกุล : การตั้งสูตรตำรับ การแสดงลักษณะเฉพาะและการเข้าสู่เซลล์
แบบนอกของโซลิดลิพิดนาโนพาร์ทิเคิลที่บรรจุสารสกัดบัวบก.

(FORMULATION, CHARACTERIATION AND IN VITRO UPTAKE INTO
ECV-304 CELL OF SOLID LIPID NANOPARTICLES CONTAINING
CENTELLA ASIATICA EXTRACTS) อ.ที่ปรึกษา: ศ.ดร.กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, อ.
ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 152 หน้า.

สารเอเชียติค แอซิดและเอเชียติคโคไซด์จากใบบัวบกมีคุณสมบัติการละลายน้ำได้น้อย ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีโซลเว็นอิมัลชันคิสพิวชันและวิธีโฮโมจีไนเซชันอุณหภูมิสูง (เฮททีเฮซ) ในการเตรียมโซลิดลิพิดนาโนพาร์ทิเคิล (เอสแอลเอ็น) ที่ประกอบด้วยสารทั้งสองชนิดดังกล่าว เจลเซีย 44/14 และคอมพลีทอล 888 ถูกใช้เป็นไขมันแข็ง โพลอกซาเมอร์ 188, ทวิน 80 ฟอสโฟไลพอน 90 เฮซ และฟอสโฟไลพอน 40 ถูกใช้เป็นสารลดแรงดึงผิวแบบเดี่ยวและผสม เอสแอลเอ็นที่ไม่มียาที่ประกอบด้วยคอมพลีทอลและโพลอกซาเมอร์สามารถเตรียมได้แต่ไม่คงตัวหลังการเก็บรักษา ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของเอสแอลเอ็นที่ประกอบด้วยเจลเซียที่ใช้ทวิน กับ ฟอสโฟไลพอน 40 และทวินกับฟอสโฟไลพอน 90 เฮซ เท่ากับ 103.6 ± 0.2 และ 386.5 ± 3.9 นาโนเมตร ตามลำดับ วิธีเฮททีเฮซไม่สามารถใช้เตรียมเอสแอลเอ็นเมื่อใส่สารสำคัญทั้งสองชนิดและทำให้เกิดความไม่คงตัวทางกายภาพ ในทางตรงข้ามวิธีโซลเว็นอิมัลชันคิสพิวชันสามารถใช้เตรียมเอสแอลเอ็นของเอเชียติคโคไซด์และเอเชียติคแอซิดได้สารแขวนตะกอนใส เมื่อใช้เจลเซียเป็นไขมันและทวิน 10 % น้ำหนักโดยปริมาตร เมื่อใช้ฟอสโฟไลพอน 90 หรือฟอสโฟไลพอน 40 เป็นสารลดแรงดึงผิวร่วม อย่างไรก็ตามเฉพาะเอสแอลเอ็นของเอเชียติคที่มีความคงตัวทางกายภาพหลังเก็บรักษานาน 3 เดือน เอสแอลเอ็นของเอเชียติค แอซิดมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 22 ± 0.35 และ 25 ± 0.25 นาโนเมตร เมื่อใช้ทวินกับฟอสโฟไลพอน 40 และทวินกับฟอสโฟไลพอน 90 เป็นสารลดแรงดึงผิวร่วมกัน ตามลำดับ ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์คั่งค้างในเอสแอลเอ็นที่เตรียมได้อยู่ภายใต้เกณฑ์ที่ยอมรับได้ การปลดปล่อยของเอเชียติค แอซิดหลัง 2 ชั่วโมงต่ำประมาณ 30 และ 20 % จากเอสแอลเอ็นที่ประกอบด้วยทวินกับฟอสโฟไลพอน 40 และทวินกับฟอสโฟไลพอน 90 ตามลำดับ การศึกษาการส่งผ่านของเอสแอลเอ็น พบว่าค่าคงที่ความต้านทานทางไฟฟ้าผ่านชั้นเดี่ยวของเซลล์อีซีวี-304 เท่ากับ 125 ± 5.0 โอห์ม*ตารางเซนติเมตรหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 12 วัน ประมาณ 30-35 % ของเอสแอลเอ็นของเอเชียติคผ่านเข้าสู่ส่วนบนของผิวเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว การที่พาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ขึ้นกับการเกิดเอนโดไซโทซิส ความเข้มของเอฟไอทีซีจากเอสแอลเอ็นของเอเชียติค แอซิดที่ประกอบด้วยทวินกับฟอสโฟไลพอน 90 และทวินกับฟอสโฟไลพอน 40 แสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์เกต เท่ากับ 4.28 ± 0.28 และ 3.74 ± 0.48 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าสารละลายของเอฟไอทีซี (% เกต = 2.64 ± 1.32) การวัดความอยู่รอดของเซลล์พบว่าขนาดของยาที่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของเอสแอลเอ็นของเอเชียติค แอซิดเมื่อใช้ ทวิน80 กับฟอสโฟไลพอน 90 หรือฟอสโฟไลพอน 40 เท่ากับ 166.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมและ 176.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ภาควิชา เกษัตริศาสตร์
สาขาวิชา เกษัตริศาสตร์
ปีการศึกษา 2550

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

4876574333: MAJOR INDUSTRIAL PHARMACY

KEY WORD: ASIATICOSIDE/ ASIATIC ACID/ SOLID LIPID NANOPARTICLES/ SOLVENT DIFFUSION/CELLULAR UPTAKE/ECV-304

NIPHAN NGAECHAROENKUL: FORMULATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO UPTAKE INTO ECV-304 CELL OF SOLID LIPID NANOPARTICLES CONTAINING CENTELLA ASIATICA EXTRACTS. THESIS ADVISOR: PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D., 152 pp.

Asiatic acid and Asiaticoside, substances from *Centella asiatica*, are poorly water soluble. In this study, solvent diffusion and high pressure homogenizer (HPH) methods were used to prepare solid lipid nanoparticles (SLN) containing these two substances. Gelucire[®] 44/14 and Compritol[®] 888 ATO were used as solid lipids. Poloxamer 188, Tween 80, Phospholipon[®] 90 H and Phospholipon[®] 40 were used as single and combined surfactants. Drug free SLN containing Compritol[®] or Poloxamer could be prepared but were unstable after storage. SLN containing Gelucire[®] using Tween with Phospholipon 40[®] and Tween with Phospholipon[®] 90 showed mean particle size of 103.6±0.2 and 386.5±3.9 nm, respectively. Loading these two active substances could not obtain SLN by HPH method and caused physical instability. In contrast, the solvent diffusion method could be used to prepare translucent colloidal dispersions of Asiaticoside and Asiatic acid SLN using Gelucire[®] as a lipid and 10 % w/v Tween with either Phospholipon[®] 90 or phospholipon[®] 40 as co-surfactant. However, only Asiatic acid SLN was physically stable after storage for 3 months. Both formulations of Asiatic acid SLN exhibited mean particle size of 22±0.35 and 25±0.25 nm when using Tween with Phospholipon[®]40 and Tween with Phospholipon[®]90 as combined surfactants, respectively. The level of organic solvent residual in the prepared SLN was within the general limit of compendia. The release of Asiatic acid after 2 hours was low at about 30 and 20 % from SLN containing Tween with Phospholipon[®]40 and Tween with Phospholipon[®]90, respectively. To study the transport of SLN, the constant transepithelial electrical resistance across ECV-304 cells monolayer was 125±5.0 ohm*cm² after cell culturing for 12 days. About 30-35% Asiatic SLN was rapidly passed into the basolateral compartment. The particle uptake was to confirm the cell endocytosis. The FITC intensity from Asiatic acid SLN containing Tween with Phospholipon[®]90 and Tween with Phospholipon[®]40, presented in term of % Gated were 4.28±0.28 and 3.74±0.48, respectively, which were higher than FITC solutions (% Gated= 2.64±1.32). For measurement of cell viability, LD₅₀ of Asiatic acid SLN using Tween 80 with either Phospholipon 90[®] or Phospholipon 40[®] were 166.57 µg/ml and 176.57 µg/ml respectively.

Department: Manufacturing pharmacy
Field of Study: Industrial pharmacy
Academic Year: 2007

Student's Signature: ..Niphan.....
Advisor's Signature: ..Garnpimol C. Ritthidej.....
Co-advisor's Signature: ..Vimolmas Lipipun.....

ACKNOWLEDGEMENTS

Many people have contributed to accomplish this study of which I sincerely appreciate their advice and kind cooperation. First, I would like to express my sincere thanks and gratitude to my thesis advisor, Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D., and my thesis co-advisor, Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D., for their in valuable advice, guidance, encouragement and understanding throughout this study. Their kindness and cheerfulness are also deeply appreciated.

I would like to acknowledge the thesis committee for their valuable and discussion.

I wish to thank staffs, my friends and colleagues in Department of Manufacturing Pharmacy and other persons whose names have not been mentioned here for their assistance and encouragement.

Above all, I would like to express my thanks to my parents, sister and brothers for their assistance, cheerfulness, and endless love throughout my life.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	5
III EXPERIMENTAL.....	45
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	58
V CONCLUSIONS.....	105
REFERENCES.....	116
APPENDICES.....	124
APPENDIX A.....	125
APPENDIX B.....	129
VITA.....	152

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Pharmaceutical preparation containing <i>Centella asiatica</i> extracts.....	8
2	Lipids used for preparation SLN.....	17
3	Stabilizers and methods used for preparation of SLN.....	20
4	Compositions and source of commercially available lecithin.....	27
5	Examples of drugs incorporated in SLN.....	42
6	The range of inside diameters of 20-25 hypodermic gauge size.....	49
7	The composition of SLN prepared by solvent diffusion method.....	50
8	The composition of SLN prepared by HPH method.....	52
9	Physical appearance of SLN containing GC as solid lipid with different type and amount of surfactant and combined surfactant prepared by solvent diffusion method.....	61
10	Physical appearance of SLN containing GB as solid lipid with different type and amount of surfactant and combined surfactant prepared by solvent diffusion method.....	63
11	The pH and osmolality of GC-SLN prepared by solvent diffusion method before, after autoclaving and after storage for 3 months.....	70
12	Particle size, zeta potential and osmolality of GC-SLN prepared by solvent diffusion method before autoclaving.....	72
13	Particle size, zeta potential and osmolality of GC-SLN prepared by solvent diffusion method after autoclaving.....	73
14	Particle size, zeta potential and osmolality of GC-SLN prepared by solvent diffusion method after storage for 3 months.....	74
15	Physical appearance of SLN dispersion containing GB as solid lipid with different type and amount of surfactant and combined surfactants prepared by HPH method.....	78

Table	Page
16	Physical appearance of SLN dispersion containing GC as solid lipid with different type and amount of surfactant and combined surfactants prepared by HPH method..... 79
17	The pH and osmolarity of GB-SLN prepared by HPH method both before, after autoclaving and after storage for 3 months..... 80
18	The pH and osmolarity of GC-SLN prepared by HPH method both before, after autoclaving and after storage for 3 months..... 81
19	The physical appearance of AA loaded GC-SLN dispersion with various surfactant and combined surfactants prepared by solvent diffusion method..... 85
20	The physical appearance of AS loaded GC-SLN dispersion with various surfactant and combined surfactants prepared by solvent diffusion method..... 86
21	The pH, osmolality of AA loaded GC-SLN before, after autoclaving and after storage for 3 months..... 87
22	The pH, osmolality of AS loaded GC-SLN before, after autoclaving and after storage for 3 months..... 88
23	The particle size, zeta potential of AA loaded GC-SLN of both before and after storage at room temperature for 3 months..... 89
24	The physical appearance of AA, AS loaded GC-SLN and GB-SLN dispersion with various combined surfactants prepared by HPH method..... 90
25	The pH and osmolality of AA loaded GC-SLN and AA loaded GB-SLN prepared by HPH method before, after autoclaving and after storage for 3 months..... 91
26	Particle sizes and zeta potential of AA loaded GC-SLN both before and after accelerated condition..... 93

Table	Page
27 The pH and osmolality of AA loaded GC-SLN both before and after accelerated condition.....	93
28 The % release of AA loaded GC-SLN.....	94
29 The particle sizes, zeta potential, pH and osmolarity of AA loaded GC-SLN of both before and after storage at room temperature for 3 months.....	97
30 The particle sizes, zeta potential, pH and osmolarity of AA loaded GC-SLN of both before and after storage at 4 °C in refrigerator for 3 months.....	98
31 Viability of peritoneal macrophage after 20 hours of in vitro culture with surfactant solutions at a concentration of 0.01 % (equivalent to a SLN concentration of 0.1 %).	100
32 Calibration data of AA in methanol solution at 210 nm.....	118
33 Data of precision of AA.....	119
34 The percentage of recovery of AA with blank solution T-80:PL-40.....	119
35 The percentage of recovery of AA with blank solution T-80:PL-40.....	119
36 The stability data of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40, T-80:PL-90 of both before and after exposure to the ambient and accelerated condition.....	121

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Centella asiatica (Linn.) Urban.....	5
2	Chemical structures of asiaticoside, madecassic acid and Asiatic acid.....	7
3	The schematic of static homogenizing.....	28
4	The schematic procedure of hot and cold homogenization techniques for SLN production.....	29
5	Proposed model for the internal structure of SLN.....	36
6	Partitioning effects on during the production of SLN by the hot homogenization technique.....	38
7	The cell viability study of AA loaded GC-SLN using T-80 with PL-40 in ECV-304 cells.....	100
8	The cell viability study of AA loaded GC-SLN using T-80 with PL-90 in ECV-304 cells.....	101
9	Cellular uptake of AA loaded GC-SLN using T-80 with PL-90.....	103
10	Cellular uptake of AA loaded GC-SLN using T-80 with PL-40.....	104
11	Calibration curve of AA in methanol at 210 nm.....	118
12	HPLC chromatogram of placebo solution (T-80:PL-40) in methanol....	120
13	HPLC chromatogram of placebo solution (T-80:PL-40) in methanol....	120
14	The TEM micrograph of GC-SLN before autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-90).....	122
15	The TEM micrograph of GC-SLN after autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-90).....	122
16	The TEM micrograph of GC-SLN after storage fore 3 months prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-90).....	122
17	The TEM micrograph of GC-SLN before autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40).....	123

Figure	Page
18	The TEM micrograph of GC-SLN after autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40)..... 123
19	The TEM micrograph of GC-SLN after storage fore 3 months prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40)..... 123
20	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN before autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40) for storage at room temperature..... 124
21	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN after autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40) for storage at room temperature..... 124
22	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40) after storage at room temperature for 3 moths 124
23	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN before autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40) for storage at refrigerator..... 125
24	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN after autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40) for storage at refrigerator..... 125
25	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-40) after storage for 3 months at refrigerator..... 125
26	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN before autoclaving prepared by solvent diffusion method(T-80:PL-90) for storage at room temperature..... 126
27	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN after autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-90) for storage at room temperature..... 126
28	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN prepared by solvent diffusion method after storage for 3 months at room temperature..... 126

Figure	Page
29	The TEM micro graph of AA loaded GC-SLN before autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL90) for storage in refrigerator..... 127
30	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN after autoclaving prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-90) for storage in refrigerator..... 127
31	The TEM micrograph of AA loaded GC-SLN prepared by solvent diffusion method (T-80:PL-90) after storage for 3 months in refrigerator..... 127
32	Particle size distribution of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-40 (8:2) by solvent diffusion method before autoclaving for kept at room temperature..... 128
33	Particle size distribution of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-40 (8:2) by solvent diffusion method after autoclaving for kept at room temperature..... 128
34	Particle size distribution of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-40 (8:2) by solvent diffusion method after storage for 3 months at room temperature..... 128
35	Particle size distribution of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-90 (8:2) by solvent diffusion method before autoclaving for kept at room temperature..... 129
36	Particle size distribution of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-90 (8:2) by solvent diffusion method after autoclaving for kept at room temperature..... 129
37	Particle size distribution of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-90 (8:2) by solvent diffusion method after storage for 3 months at room temperature..... 129
38	The zeta graph of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-40 (8:2) by solvent diffusion before autoclaving for kept at room temperature..... 130

Figure	Page
39	The zeta graph of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-40 (8:2) by solvent diffusion after autoclaving for kept at room temperature..... 130
40	The zeta graph of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-40 (8:2) by solvent diffusion after storage for 3 months at room temperature..... 130
41	The zeta graph of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-90 (8:2) by solvent diffusion before autoclaving for kept at room temperature..... 131
42	The zeta graph of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-90 (8:2) by solvent diffusion after autoclaving for kept at room temperature..... 131
43	The zeta graph of drug free SLN dispersions containing GC as solid lipid with T-80:PL-90 (8:2) by solvent diffusion after storage at room temperature for 3 months..... 131
44	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) before autoclaving for kept in refrigerator..... 132
45	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after autoclaving for kept in refrigerator..... 132
46	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after storage for 3 months in refrigerator..... 132
47	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) before autoclaving for kept at room temperature..... 133
48	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after autoclaving for kept at room temperature..... 133
49	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after storage for 3 months at room temperature..... 133
50	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) before autoclaving for kept in refrigerator..... 134

Figure	Page
51	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after autoclaving for kept in refrigerator..... 134
52	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after storage for 3 months in refrigerator..... 134
53	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) before autoclaving for kept at room temperature..... 135
54	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after autoclaving for kept at room temperature..... 135
55	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after storage for 3 months at room temperature..... 135
56	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) before autoclaving for kept in refrigerator..... 136
57	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after autoclaving for kept in refrigerator..... 136
58	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after storage for 3 months in refrigerator..... 136
59	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) before autoclaving for kept at room temperature..... 137
60	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after autoclaving for kept at room temperature..... 137
61	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after storage for 3 months at room temperature..... 137
62	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) before autoclaving for kept in refrigerator..... 138
63	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after autoclaving for kept in refrigerator..... 138
64	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after storage for 3 months in refrigerator..... 138

Figure	Page
65	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) before autoclaving for kept at room temperature..... 139
66	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after autoclaving for kept at room temperature..... 139
67	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after storage for 3 months at room temperature..... 139
68	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) before autoclaving for kept at freeze thaw condition..... 140
69	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after autoclaving for kept at freeze thaw condition..... 140
70	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after storage at freeze thaw condition..... 140
71	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) before autoclaving for kept at freeze thaw condition..... 141
72	The particle size distribution of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after autoclaving for kept at freeze thaw condition..... 141
74	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) before autoclaving for kept at freeze thaw condition..... 142
75	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after autoclaving for kept at freeze thaw condition..... 142
76	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-40 (8:2) after storage at freeze thaw condition..... 142
77	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) before autoclaving for kept freeze thaw condition..... 143
78	The zeta graph of AA loaded GC-SLN with T-80:PL-90 (8:2) after autoclaving for kept freeze thaw condition..... 143

LIST OF ABBREVIATIONS

AA	=	Asistic acid
AD	=	Alzheimer's disease
AS	=	Asisticoside
°C	=	degree Celsius
DSC	=	differential scanning calorimetry
et al	=	et alii (and other)
FAD	=	familial Alzheimer's disease
FDA	=	Federal Drug Administration
GB	=	glycerol behenate
GC	=	Gelucire® 44/14
HPH	=	high pressure homogenizer
HPLC	=	high performance liquid chromatography
hr	=	hour(s)
IR	=	infared spectroscopy
nm	=	nanometer(s)
ND	=	not determined
NMR	=	nuclear magnetic resonance
mOsm/L	=	milliosmol per liter
ml	=	milliliter
o/w	=	oil in water emulsion
P-188	=	poloxamer 188
PL-40	=	Phospholipon 40
PL-90	=	Phospholipon 90
pH	=	the negative logarithym of the hydrogen ion concentration
psi	=	pound(s) per square inch
R ²	=	coefficient of determination
rpm	=	revolution per minute
µg	=	microgram(s)

μm	=	micrometer(s)
μl	=	microliter(s)
SAD	=	sporadic Alzheimer's disease
SD	=	stand deviation
SLN	=	solid lipid nanoparticle
TEM	=	Transmission electron microscopy
T-80	=	Tween 80
W/V	=	weight by volume
W/W	=	weight by weight
%	=	percentage
>	=	more than
<	=	less than
α	=	alpha
β	=	beta
β'	=	beta prime