

สารออกฤทธิ์สำหรับเครื่องสำอางจากเกลบ



นายอิสัม ตนศิริภักดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COSMETIC ACTIVES FROM RICE HUSK

Mr. Ilhum Tonsiripakdee

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

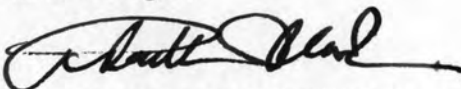
Copyright of Chulalongkorn University

491658

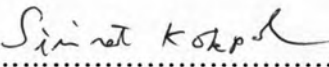
SEP 2006


Thesis Title Cosmetic Actives from Rice Husk
By Mr. Ilhum Tonsiripakdee
Field of Study Biotechnology
Thesis Advisor Associate Professor Supason Wanichweacharunguang, Ph.D

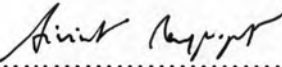
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Master's Degree

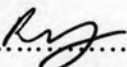

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D)

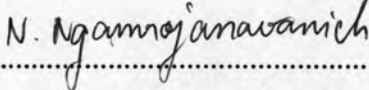
THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph.D)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Supason Wanichweacharunguang, Ph.D)


.....Member
(Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D)


.....Member
(Associate Professor Preeda Boon-Long, Ph.D)


.....Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D)

อิลฮัม ตนศิริภักดี : สารออกฤทธิ์สำหรับเครื่องสำอางจากแกลบ (COSMETIC ACTIVES FROM RICE HUSK) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.ศุภศร วนิชเวชรุ่งเรือง, 94 หน้า

ในงานวิจัยนี้ได้นำแกลบข้าวสลายพันธุ์ชัยนาท 1 ลูกแดงปัตตานี เล็บนกปัตตานี กข 1 และหอมมะลิ มาสกัด และตรวจกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากส่วนสกัดหยาบ โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่มุ่งตรวจสอบครอบคลุมได้แก่ ฤทธิ์ด้านการทำงานของไทโรซิเนส ฤทธิ์ด้านการออกซิเดชัน และฤทธิ์การกรองรังสียูวี พบว่าส่วนสกัดโคคลอโรมีเทน และส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของแกลบจากข้าวสลายพันธุ์ชัยนาท 1 ให้ฤทธิ์ด้านการออกซิเดชันที่ดี และสามารถยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส นอกจากนี้ยังสามารถดูดกลืนรังสียูวีทั้งในช่วงยูวีเอ และยูวีบีได้ การแยกส่วนสกัดดังกล่าวด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด การหาสูตรโครงสร้างของสารทั้งสองโดยใช้วิธีทาง สเปกโตรสโกปี พบว่าเป็น ไดเพนทิลฟทาเลท (คิดเป็น 0.16% โดยน้ำหนัก) และ 4-ไฮดรอกซี-3-เมทอกซีซินนามาลดีไฮด์ (คิดเป็น 0.22% โดยน้ำหนัก) จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ทั้งสอง พบว่า ไดเพนทิลฟทาเลท มีฤทธิ์ด้านการทำงานของไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับสารมาตรฐานกรดโคจิกที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ 4-ไฮดรอกซี-3-เมทอกซีซินนามาลดีไฮด์ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน butylated hydroxytoluene (BHT) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 69.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ BHT ให้ค่า IC_{50} เป็น 42.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารดังกล่าวสามารถดูดกลืนรังสียูวีเอได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ϵ) เท่ากับ 32,000 ต่อเซนติเมตรต่อโมลาร์ ที่ความยาวคลื่นสูงสุดคือ 339 นาโนเมตร

ในงานวิจัยนี้ยังพบสารในกลุ่มแอลคีน และ แอนทราซีน ในส่วนสกัดจากแกลบด้วย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต..... อิลฮัม ตนศิริภักดี.....
ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ศุภศร วนิชเวชรุ่งเรือง.....

4772574523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ANTIOXIDANT ACTIVITY / ANTI-TYROSINASE ACTIVITY / UV
SCREENING ACTIVITY

ILHUM TONSIRIPAKDEE: COSMETIC ACTIVES FROM RICE HUSK.
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPASON
WANICHWEACHARUNGRUANG, Ph.D., 94 pp.

In this work, rice husks from five strains of rice cultivar, Chai-nat 1 (CN), Look Daeng Pattani (LD), Leb Nok Pattani (LN), Go Ko 1 (GK) and Jasmine (JM), were extracted and screened for biological activities including anti-tyrosinase, antioxidant and UV screening activity. The dichloromethane and ethylacetate crude extracts of CN possess potent radical scavenging effect, moderate inhibition effect toward tyrosinase, and some UV (290-400 nm) absorption property. The active compounds in CN crude extract were isolated by chromatographic techniques and identified as dipentyl phthalate (0.16% w/w yield) and 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (0.22% w/w yield) by ^1H and ^{13}C NMR, IR and mass spectroscopy. Dipentyl phthalate showed inhibitory effect toward tyrosinase while 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde exhibited strong antioxidant activity and UV screening activity. Anti-tyrosinase activity of dipentyl phthalate at concentration of 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was equivalent to that of reference kojic acid at concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde possessed similar 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity to that of the reference butylated hydroxytoluene (BHT). The IC_{50} values were 69.49 and 42.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde and BHT, respectively. In addition, 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde possessed UVA absorption property with 339 nm and the molar absorptivity of 32,000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Furthermore, alkene and anthracene were also found in CN extract.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature.....*Ilhum T.*.....

Academic year.....2006..... Advisor's signature.....*Supason*.....

ACKNOWLEDGEMENTS

Many people have contributed to development of this study, which I am very appreciated for their kind cooperation and their advice. First, and foremost, I would like to express my gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Supason Wanichweacharungruang for her invaluable advice, guidance, encouragement, understanding throughout this study. Her kindness and cheerfulness are also deeply appreciated.

I also gratefully acknowledge the members of my thesis committee, Assoc. Prof. Dr. Sirirat Kokpol, Assoc. Prof. Dr. Sirirat Rengpipat, Assoc. Prof. Dr. Preda Bun-long and Assoc. Prof. Dr. Nattaya Ngamroanavanich for discussion, advice and dedicating time for thesis examination.

I greatly appreciated the Graduated school, Chulalongkorn University for partial financial supports (Ratchadapiseksompote fund, 90 years CU fellowship) of this thesis.

Special thanks are extended to Miss Rattanan Tuangudomsup for NMR analysis and all members of research group for helping in discussion, opinion and encouragements.

Finally, I would like to affectionately give all my gratitude to my parent and the members of my family for their love, encouragements and understanding throughout my entire study. Without them, I would never have been able to achieve this goal.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF TABLES.....	xii
LIST OF SCHEMES.....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
Introduction.....	1
Literature reviews.....	4
Biological activities in cosmetic and personal care products.....	11
Objective of research.....	28
CHAPTER II EXPERIMENTAL.....	29
2.1 Instruments and equipments.....	29
2.2 Chemicals.....	30
2.3 Materials.....	30
2.4 Extraction and isolation.....	31
2.5 Biological activities section.....	32
CHAPTER III RESULTS AND DISCUSSION.....	35
3.1 Screening of antioxidant, anti-tyrosinase and UV screening activity from crude rice husks.....	35
3.2 Extraction and isolation.....	37
3.3 Biological activities of CN I.....	37
3.4 Biological activities of CN I-1 to CN I-8.....	39
3.5 Characterization of isolated compounds.....	46
3.6 Biological activities of isolated compounds.....	55
CHAPTER IV CONCLUSION.....	60
REFERENCES	62

	Page
APPENDICES.....	70
Appendix A.....	71
Appendix B.....	72
Appendix C.....	77
Appendix D.....	93
VITA.....	94

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Summarized the main kind of bioproducts.....	2
1.2 The molecular structure of quercetin, protocatechuic acid, hyperin, rutin and 3,4-dihydroxybenzaldehyde.....	5
1.3 The molecular structure of daidzein, daidzin, genistin and genistein.....	6
1.4 The molecular structure of protocatechuic acid methyl ester.....	6
1.5 The molecular structure of hydroxytyrosol.....	7
1.6 The molecular structure of citrullin.....	7
1.7 The molecular structure of chlorogenic acid.....	8
1.8 The molecular structure of corilagin and ellagic acid.....	8
1.9 The molecular structure of ferulic acid and <i>p</i> -coumaric acid.....	10
1.10 The molecular structure of azelaic acid.....	10
1.11 The synthetic antioxidants.....	13
1.12 The natural antioxidants.....	14
1.13 Diagram of (A) layer of human skin and (B) melanin in melanocyte.....	15
1.14 Melanin biosynthesis pathway.....	16
1.15 The three physiological states of the active site of tyrosinase.....	17
1.16 The structure of some tyrosinase inhibitors, that presumably act as copper chelator.....	18
1.17 Some tyrosinase inhibitor, that act as substrate analogues.....	19
1.18 Structure of hydroquinone.....	20
1.19 Structure of arbutin.....	20
1.20 Structure of kojic acid.....	21
1.21 Structure of glabridin.....	22
1.22 The ultraviolet photons harm the DNA molecules of living.....	23
1.23 Structure of DPPH [•] and DPPH.....	24
1.24 Structure of rice grain.....	25
3.1 UV spectrum of CN I at concentration of 70 µg/ml.....	38
3.2 UV spectrum of some separated fractions (A) CN I-2 fractions at 30 µg/ml (B) CN I-6 fractions at 50 µg/ml (C) CN I-7 fractions at 50 µg/ml and (D) CN I-8 fractions at 30 µg/ml.....	40

Figure	Page
3.3 Semi-preparative HPLC chromatogram obtained from separation of CN I-2/3-2 fraction.....	41
3.4 Semi-preparative HPLC chromatogram obtained from separation of CN I-8/2-1 fraction.....	42
3.5 The COSY correlation of dipentyl phthalate.....	47
3.6 The key HMBC correlation of dipentyl phthalate.....	47
3.7 The positive ESI-MS spectrum of 5-dipentyl phthalate.....	48
3.8 The COSY correlation of 5-decene.....	49
3.9 The key HMBC correlation of 5-decene.....	49
3.10 The positive ESI-MS spectrum of 5-decene.....	50
3.11 The COSY correlation of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	52
3.12 The key HMBC correlation of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	53
3.13 The negative ESI-MS spectrum of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	53
3.14 NMR spectrum of (A) freshly CN I-8/2-1 and (B) A 20 days old CN I-8/2-1..	54
3.15 Resonance effects of (A) 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde and (B) Butylated hydroxytoluene (BHT).....	56
3.16 The UV spectrum of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde at 5 µg/ml.....	58
B-1 UV spectrum of crude extract of Chai-nat 1 (CN) strain	72
B-2 UV spectrum of EtOAc crude extract of Chi-nat I (CN) strain.....	72
B-3 UV spectrum of CH ₂ Cl ₂ crude extract of Look Daeng Pattani (LD).....	73
B-4 UV spectrum of EtOAc crude extract of Look Daeng ptattani (LD).....	73
B-5 UV spectrum of EtoAc crude extract of Lab Nok Pattani (LN).....	74
B-6 UV spectrum of EtoAc crude extract of Jasmine (JM).....	74
B-7 UV spectrum of MeOH crude extract of Jasmine (JM).....	75
B-8 UV spectrum of EtOAc crude extract of Go Ko 1 (GK).....	75
B-9 UV spectrum of MeOH crude extract of Go Ko 1 (GK).....	76
C-1 The ¹³ C NMR spectrum (CDCl ₃) of dipentyl phthalate.....	77
C-2 The ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃) of dipentyl phthalate.....	78
C-3 The HSQC spectrum (CDCl ₃) of dipentyl phthalate.....	79

Figure	Page
C-4 The COSY spectrum (CDCl ₃) of dipentyl phthalate.....	80
C-5 The HMBC spectrum (CDCl ₃) of dipentyl phthalate.....	81
C-6 The IR spectrum of dipentyl phthalate.....	82
C-7 The ¹³ C NMR spectrum (CDCl ₃) of 5-decene.....	83
C-8 The ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃) of 5-decene.....	84
C-9 The COSY spectrum (CDCl ₃) of 5-decene.....	85
C-10 The HMBC spectrum (CDCl ₃) of 5-decene.....	86
C-11 The IR spectrum of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	87
C-12 The ¹³ C NMR spectrum (CDCl ₃) of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	88
C-13 The ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃) of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	90
C-14 The COSY spectrum (CDCl ₃) of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	91
C-15 The HSQC spectrum (CDCl ₃) of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	92
C-16 The HMBC spectrum (CDCl ₃) of 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde.....	93
D-1 Free radical scavenging capacity of (A) BHT and (B) 4-hydroxy-3-methoxy- cinnamaldehyde as determined by DPPH method.....	94

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 Resource of agricultural and their residue in Thailand.....	3
1.2 Characteristics and productivity of each rice strains.....	26
3.1 Amount (% yield) of extracts in each strains of rice husk.....	35
3.2 Primary screening tests of antioxidant, anti-tyrosinase and UV screening activity in various crude extracts (different solvents) from rice husks.....	36
3.3 Biological activities of CN I-1 to CN I-8.....	39
3.4 1D and 2D NMR spectroscopic data for dipentyl phthalate in CDCl ₃	46
3.5 1D and 2D NMR spectroscopic data for 5-alkene in CDCl ₃	49
3.6 1D and 2D NMR spectroscopic data for 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde in CDCl ₃	51

LIST OF SCHEMES

Scheme	Page
3.1 Isolation of CN I-1.....	43
3.2 Isolation of CN I-2.....	44
3.3 Isolation of CN I-8.....	45
4.1 The extraction and isolation of Chai-nat 1 (CN) husk.....	61

LIST OF ABBREVIATIONS

^{13}C NMR	Carbon 13 nuclear magnetic resonance
^1H NMR	Proton nuclear magnetic resonance
$^{\circ}\text{C}$	Degree of Celsius
BHT	Butylated hydroxytoluene
CH_2Cl_2	Dichloromethane, methylene chloride
CHCl_3	Chloroform
COSY	Correlated spectroscopy
d	doublet
dd	Doublet of doublet
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
EtOAc	Ethylacetate
EtOH	Ethanol
g	Gram (s)
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation experiment
HSQC	Heteronuclear multiple-quantum coherence experiment
J	Coupling constant
kg	Kilogram (s)
wt	Weight
IR	Infrared
L	Liter (s)
m	Multiplet (NMR)
MeOH	Methanol
mg	Milligram (s)
mL	Milliliter

mM	Millimolar
MS	Mass spectrometry
MW	Molecular weight
m/z	Mass to charge ratio
M ⁺	Molecular ion
ppm	Part per million
q	Quartet
ROS	Reactive oxygen species
R _f	Retardation factor
s	Singlet (NMR)
SiO ₂	Silica gel
t	Triplet (NMR)
TLC	Thin layer chromatography
δ	Chemical shift
μg	Microgram (s)
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume
w/w	Weight by weight
λ _{max}	Maximum wavelength
ε	Molar absorptivity