

การพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลที่บรรจุสารสกัดแคลลัสของรางจืดสำหรับวัสดุปิดแผล

นางสาวสุภาพร เกตุพิทยา



ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5376565533

DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES CONTAINING CALLUS EXTRACT OF
THUNBERGIA LAURIFOLIA FOR WOUND DRESSING MATERIAL

Miss Supaporn Ketpitthaya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy
Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES CONTAINING
CALLUS EXTRACT OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA*
FOR WOUND DRESSING MATERIAL

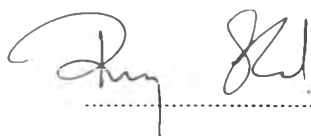
By Miss Supaporn Ketpitthaya

Field of Study Industrial Pharmacy

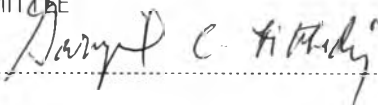
Thesis Advisor Phanphen Wattanaarsakit, Ph.D.

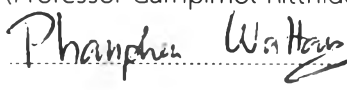
Thesis Co-Advisor Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.

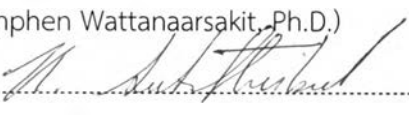
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

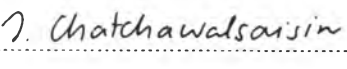

..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

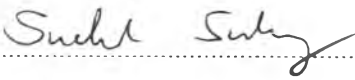
THESIS COMMITTEE

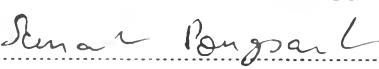

..... Chairman
(Professor Garmpimol Ritthidej, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Phanphen Wattanaarsakit, Ph.D.)


..... Thesis Co-Advisor
(Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)


..... Examiner
(Jittima Chatchawalsaisin, Ph.D.)


..... Examiner
(Associate Professor Suchada Sukrong, Ph.D.)


..... External Examiner
(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)



สุภาพร เกตุพิทยา : การพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลที่บรรจุสารสกัดแคลลัสของรางจืดสำหรับวัสดุปิดแผล.
(DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES CONTAINING CALLUS EXTRACT OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA* FOR WOUND DRESSING MATERIAL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.พรรณเพ็ญ วัฒนาอาชาภิจ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.นฤพร สุตินทวิบูลย์, 127 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งสารสกัดแคลลัสของรางจืดในรูปแบบไมโครพาร์ทิเคิลและวัสดุปิดแผล ไมโครพาร์ทิเคิลที่กักเก็บสารสกัดนี้เตรียมจากกระบวนการพ่นแห้งและกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยใช้พอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกผลทุเรียน (ดีจี) และโซเดียมแอลจีเนต (เอจี) เป็นพอลิเมอร์ สูตรตำรับไมโครพาร์ทิเคิลของสารสกัดแคลลัสของรางจืดที่มีความคงตัวถูกคัดเลือกเป็นส่วนประกอบสำหรับการเตรียมแผ่นแปะแผลที่ผลิตจากพอลิเมอร์ดีจี 1 เปอร์เซ็นต์โดยกระบวนการพ่นแห้งแบบเยือกแข็ง กรดโรสมารินิกใช้เป็นสารบ่งชี้ทางเคมีและเป็นสารตัวช่วยในการศึกษากระบวนการพ่นแห้งสารสกัดแคลลัส การศึกษาเบื้องต้นของระบบไมโครพาร์ทิเคิลของกรดโรสมารินิกพบว่าอนุภาคไมโครพาร์ทิเคิลที่ได้จากกระบวนการพ่นแห้งมีรูปร่างกลมในขณะที่กระบวนการพ่นแห้งแบบเยือกแข็งจะได้ผงที่มีรูปร่างแบนไม่สม่ำเสมอ พอลิเมอร์ดีจีส่งผลต่อลักษณะการหดตัวของอนุภาคที่ได้จากกระบวนการพ่นแห้งและอนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่มากกว่าที่เตรียมจากพอลิเมอร์เอจีในทั้งสองกระบวนการ ดีจีส่งผลให้ลักษณะพื้นผิวอนุภาคมีความขรุขระมากกว่าเอจีและส่วนผสมของพอลิเมอร์ทั้งสองทำให้ลักษณะพื้นผิวเรียบขึ้น การศึกษาด้านลักษณะทางของแข็งพบว่ากรดโรสมารินิกอยู่ในรูปอสัณฐานและถูกประกอบเข้าไปในส่วนของพอลิเมอร์เนื่องจากไม่ปรากฏส่วนที่แสดงถึงจุดหลอมเหลวของสาร ความสามารถในการกักเก็บกรดโรสมารินิกของไมโครพาร์ทิเคิลแบบพ่นแห้งที่ผ่านกระบวนการเชื่อมขวางมีค่าน้อยกว่าแบบที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางอย่างมากและไมโครพาร์ทิเคิลที่ได้จากกระบวนการพ่นแห้งมีความสามารถในการกักเก็บสารต่ำกว่าอนุภาคที่ได้จากกระบวนการพ่นแห้งแบบเยือกแข็ง การใช้ดีจีทำให้ได้การปลดปล่อยสารสำคัญที่ช้ากว่าเอจีเนื่องจากโครงสร้างของ ดีจีนั้นเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายลูกโซ่จึงส่งผลให้เกิดเจลของพอลิเมอร์มากกว่าและมีการควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญได้นานกว่า กรดโรสมารินิกมาตรฐานแสดงถึงความคงสภาพที่ลดลงร้อยละ 26.44 ภายหลัง 3 เดือน สูตรตำรับที่คงสภาพ 5 ตำรับประกอบด้วย SN-1AG, FC-1DG, FC-2AG, FC-2DG และ FC-2DGAG1:1 ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาเป็นระบบพ่นแห้งสารสกัดจากแคลลัสของรางจืด แคลลัสรางจืดเจริญบนอาหารเลี้ยงที่มีฮอร์โมนพืชเอ็นเอเอ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและฮอร์โมนบีเอ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ความดันสูงซึ่งพบว่าใน สารสกัดแคลลัส 1 มิลลิกรัมประกอบด้วยกรดโรสมารินิก 22.05 ไมโครกรัมและได้ผลผลิตของสารสกัดแคลลัสร้อยละ 4.72 ไมโครพาร์ทิเคิลของสารสกัดแคลลัสเตรียมจากสูตรตำรับที่เลือกมา ผลของการศึกษารูปร่าง สภาวะทางของแข็งและความสามารถในการกักเก็บได้ผลการศึกษาที่เหมือนกับการศึกษาการกักเก็บกรดโรสมารินิก แต่สูตรตำรับ TC-FC-1DG ซึ่งเตรียมจากดีจีแสดงลักษณะการปลดปล่อยที่เร็วที่สุดในช่วงต้นของการปลดปล่อยสาร และสูตรตำรับ TC-FC-2DGAG1:1 แสดงการปลดปล่อยด้วยอัตราเร็วที่สุดในช่วงต่อมา สูตรตำรับ TC-FC-2DGAG1:1 มีความคงสภาพของกรดโรสมารินิกดีที่สุดในทุกสภาวะที่ศึกษา ไมโครพาร์ทิเคิลที่บรรจุสารสกัดเหล่านี้ได้ถูกนำไปเป็นส่วนประกอบสำหรับการเตรียมแผ่นแปะแผลโดยกระบวนการพ่นแห้งแบบเยือกแข็ง แผ่นแปะที่บรรจุไมโครพาร์ทิเคิลของสารสกัดแคลลัสรางจืดมีการปลดปล่อยสารสำคัญช้ากว่าแผ่นแปะที่บรรจุสารสกัดที่ไม่อยู่ในรูปแบบไมโครพาร์ทิเคิลและมีความคงสภาพที่ดีกว่าในทุกสภาวะ ผลการศึกษาข้างที่กล่าวมาสนับสนุนความสามารถของระบบนำส่งสารสกัดแคลลัสของรางจืดจากแผ่นแปะดีจีที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อใช้สำหรับวัสดุปิดแผลและมีความเหมาะสมสำหรับการพัฒนาไปใช้ในทางชีวการแพทย์ต่อไป

ภาควิชา วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

สาขาวิชา เภสัชอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต ณัฏฐพร ใจพิทยา

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก Dr.

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Dr.

5376565533 : MAJOR INDUSTRIAL PHARMACY

KEYWORDS: POLYSACCHARIDE FROM DURIAN FRUIT-HULLS/ PLANT CALLUS CULTURE/ CALLUS EXTRACT/ THUNBERGIA LAURIFOLIA/ROSMARINIC ACID/ MICROPARTICLES/ WOUND DRESSING

SUPAPORN KETPITTHAYA: DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES CONTAINING CALLUS EXTRACT OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA* FOR WOUND DRESSING MATERIAL. ADVISOR: PHANPHEN WATTANAARSAKIT, Ph.D., CO-ADVISOR: NARUEPORN SUTANTHAVIBUL, Ph.D., 127 pp.

The purpose of this study was to develop the delivery system of *Thunbergia laurifolia* Linn. (Rang Chuet) callus extract (TC) as an encapsulated microparticles and its wound dressing material. The encapsulated TC microparticles (TC-MPs) were prepared by spray drying (SD) and freeze drying (FD) processes using polysaccharide gel from durian fruit-hulls (DG) and sodium alginate (AG) as an encapsulation polymer. Selected stable TC-MPs were incorporated into freeze dried DG patch for wound dressing delivery system. Rosmarinic acid (RA) was used as chemical marker and as a model for encapsulation study of the plant callus extract. In preliminary study of the encapsulated RA microparticles, it was found that SD process created spherical shape microparticles where as FD process created irregular flat shape particles after sieving to obtain small particles. DG polymer caused shrinking on the particles obtained from SD process and produced particles larger than those of AG for both processes. Surface morphology shows that DG created more roughness than AG and the mixture of polymers lead to producing smoother surface. Solid state characterization shows that RA turned into amorphous and was incorporated into the polymer as the disappearance of its melting peak after SD and FD processes. Entrapment efficiency (%EE) of crosslinked SD microparticles was drastically lower than those of noncrosslinked, and microparticles created by SD showed lower entrapment than those from FD process. DG exhibits slower release than AG since the structure of DG has more branch chains which might have slower gelling time and longer release period of the trapped substance. Standard RA shows its stability decreased 26.44% after 3 months. Stable formulations including of SN-1AG, FC-1DG, FC-2AG, FC-2DG and FC-2DGAG1:1 were chosen for TC encapsulation. *T. laurifolia* callus were grown in MS media with 1 mg/L of NAA and 2 mg/L of BA and analyzed using HPLC and founded that 1 mg of callus extract contains 22.05 mcg of RA and %yield of callus extract was 4.72%. Selected TC-MPs were prepared. The morphology, solid state properties, entrapment efficiency results were similar to those of encapsulated RA microparticles, but TC-FC-1DG shows the fastest release at initial phase and TC-FC-2DGAG1:1 released the fastest rate in later phase. In case of stability, TC-FC-2DGAG1:1 shows the best improved stability of rosmarinic acid in all conditions. These encapsulated microparticles were incorporated into the freeze dried patch. The TC-MPs-loaded patches display slower release than the patch loaded TC (PTC) and the stability results were improved compare to PTC in all conditions. These results support the ability of TC delivery system from DG freeze dried patch used for wound dressing material and suitable to be developed further in biomedical applications.

Department: Pharmaceutics and Industrial
Pharmacy

Field of Study: Industrial Pharmacy

Academic Year: 2013

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Supaporn Ketpitthaya
Phanphen Wattanaarsakit
Narueporn Sutanthavibul



ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Dr. Phanphen Wattanaarsakit for her invaluable advice, attention and encouragement throughout my study. In addition, I wish to gratefully thank to my thesis co-advisor, Dr. Narueporn Sutanthavibul for her helpful advice and encouragement. Also I would like to express my gratitude to Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D. for the supply of polysaccharide gel extracted from Durian fruit-hulls and Associate Professor Suchada Sukrong, Ph.D. for her suggestions and support in plant cell culture part in this thesis.

I wish to express appreciation to Professor Dr. Garmpimol Ritthidej, Dr. Jittima Chatchawalsaisin and also Dr. Suchada sukrong to serve as members of the thesis committee and for their valuable suggestions and comments.

I would like to thank CU-D-HIP, Chulalongkorn University for providing equipments and services and Ratchadapiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (RES560530157-HR) for the funding on this research project.

I would like to express my appreciation to Dr. Teerapon Saponkanabhorn for thesis writing advice and also would like to extend my deep appreciation to Mr. ChalermLat Suktap, Mr. Patanachai Limpikirati and Miss. Ladda Techawiriyathaweessin for their helpful suggestions about plant cell culture.

My sincere gratitude is extended to scientist, staff and classmates in the Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their assistance and support.

Above all, I wish to express my infinite thanks and love to my family for their endless love, care, understanding and encouragement to me to finish this master thesis.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLE	xii
LIST OF FIGURE.....	xiv
LIST OF ABBREVIATIONS	xvii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
Purposes of the present study	2
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	3
1. Microencapsulation	3
1.1 Spray drying process.....	4
1.2 Freeze drying process	7
2. Plant tissue culture.....	9
2.1 <i>Thunbergia laurifolia</i> Linn. callus.....	12
3. Rosmarinic acid.....	15
4. Durian fruit hulls polysaccharide	16
5. Sodium alginate.....	19
6. Wound dressing.....	21
CHAPTER III EXPERIMENTAL	27
Materials	27
Rosmarinic acid microparticles and freeze dried patch	27
<i>Thunbergia laurifolia</i> callus culture	27
Chemicals	27
Equipments	28
Miscellaneous.....	29
Methods	29



	Page
1. Preliminary of rosmarinic acid encapsulation	29
1.1 HPLC analysis and method validation of rosmarinic acid	29
1.2 Stress test of rosmarinic acid.....	30
1.2.1 Photostability	30
1.2.2 Temperature.....	30
1.2.3 Humidity.....	30
1.2.4 Oxidation.....	31
1.3 Preparation of encapsulated rosmarinic acid microparticles.....	31
1.3.1 Spray drying process.....	32
1.3.2 Freeze drying process.....	32
1.4 Characterization of encapsulated rosmarinic acid microparticles	33
1.4.1 Morphological characterization	33
1.4.1.1 Scanning electron microscope.....	33
1.4.1.2 Dynamic Light scattering	33
1.4.2 Differential Scanning Calorimetry.....	33
1.4.3 Fourier Transform Infrared Spectrometry.....	34
1.4.4 X-Ray diffraction analysis.....	34
1.4.5 Determination of entrapment efficiency.....	34
1.4.6 <i>In vitro</i> rosmarinic acid release study	35
1.4.7 Stability study of encapsulated RA microparticles.....	35
2. <i>Thunbergia laurifolia</i> callus extract microparticles	35
2.1 Callus induction and proliferation from <i>T. laurifolia</i> leaves	35
2.2 Preparation of encapsulated TC microparticles	36
2.3 Characterizations of encapsulated TC microparticles	36
2.3.1 Morphological characterization	36
2.3.1.1 Scanning Electron Microscope	36
2.3.1.2 Dynamic Light scattering	36



	Page
1.3.2.3 Fourier-Transform Infrared Spectrometry	52
1.3.3 Determination of entrapment efficiency	58
1.3.4 <i>In vitro</i> release study	59
1.3.5 Stability study	61
2. <i>Thunbergia laurifolia</i> callus extract microparticles.....	63
2.1 Callus induction and proliferation from TL leaves	63
2.2 Morphological characterization of encapsulated TC microparticles..	64
2.2.1 Particle morphology from scanning electron microscope....	64
2.2.2 Particle size of encapsulated TC microparticles.....	66
2.3 Solid state characterization of encapsulated TC microparticles.....	67
2.3.1 Differential scanning calorimetry analysis of TC-microparticles	67
.....	67
2.3.2 X-Ray powder diffraction analysis of encapsulated TC	68
microparticles	68
2.3.3 Fourier-Transform Infrared Spectrometry.....	69
2.4 Determination of entrapment efficiency of TC microparticles.....	70
2.5 <i>In vitro</i> release study of encapsulated TC microparticles.....	71
2.6 Stability of encapsulated TC microparticles.....	72
3. TC MPs-loaded freeze dried patch.....	74
3.1 <i>In vitro</i> release study of TC MPs -loaded freeze dried patch.....	75
3.2 Stability study of TC MPs -loaded freeze dried patch	76
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	80
REFERENCES	83
APPENDICES.....	84
APPENDIX A.....	85
APPENDIX B.....	109
VITA.....	127

LIST OF TABLE

	Page
Table 1 Products of plant cell culture from various plant species and use [27].....	11
Table 2 Secondary metabolites extracted from various plant cell culture and yield [27].....	11
Table 3 Class of wound dressing, indications and commercial products [44].....	25
Table 4 Processes and formulations of encapsulated RA microparticles.....	31
Table 5 Freeze drying step for encapsulated RA microparticles.....	32
Table 6 Formulations of encapsulated-TC microparticles.....	36
Table 7 Formulations of TC MPs-loaded freeze dried patch.....	38
Table 8 Particle size of encapsulated TC microparticles.....	66
Table 9 Entrapment efficiency of encapsulated TC microparticles.....	70
Table 10 Raw data of 1 st validation of HPLC analysis.....	93
Table 11 Raw data of 2 nd validation of HPLC analysis.....	94
Table 12 Raw data of 3 rd validation of HPLC analysis.....	95
Table 13 Statistical data of calibration curves of rosmarinic acid analysis.....	97
Table 14 Precision and accuracy of method for determination of rosmarinic acid.....	98
Table 15 Stress testing data of rosmarinic acid.....	98
Table 16 Particle size of spray dried RA microparticles and freeze dried RA particles.....	99
Table 17 Entrapment efficiency of encapsulated RA microparticles.....	101
Table 18 Stability data of encapsulated RA microparticles storage at 40°C/75%RH.....	102
Table 19 Encapsulated TC particle size.....	105
Table 20 Entrapment efficiency of encapsulated TC microparticles.....	106
Table 21 <i>In vitro</i> release data of encapsulated TC microparticles.....	107
Table 22 Stability data of encapsulated TC microparticles storage at 4°C.....	107
Table 23 Stability data of encapsulated TC microparticles storage at 30°C/75%RH.....	107
Table 24 Stability data of encapsulated TC microparticles storage at 40°C/75%RH.....	108
Table 25 <i>In vitro</i> release data of TC MPs-loaded freeze dried patch.....	109
Table 26 Stability data of TC MPs-loaded freeze dried patch storage at 4°C.....	110
Table 27 Stability data of TC MPs-loaded freeze dried patch storage at 30°C/75%RH.....	110
Table 28 Stability data of TC MPs-loaded freeze dried patch storage at 40°C/75%RH.....	111
Table 29 One-Way ANOVA of Particle size of encapsulated spray dried RA microparticles.....	112
Table 30 One-Way ANOVA of Particle size of encapsulated freeze dried RA microparticles.....	114
Table 31 One-Way ANOVA of Entrapment efficiency of spray dried RA microparticles.....	116
Table 32 One-Way ANOVA of Entrapment efficiency of freeze dried RA microparticles.....	118



Table 33 One-Way ANOVA of Stability of encapsulated RA spray dried microparticles at accelerated condition.....	120
Table 34 One-Way ANOVA of Stability of encapsulated RA freeze dried microparticles at accelerated condition.....	122
Table 35 One-Way ANOVA of Particle size of encapsulated TC microparticles.....	124
Table 36 One-Way ANOVA of Entrapment of encapsulated TC microparticles.....	125
Table 37 One-Way ANOVA of Stability encapsulated TC microparticles 40°C/75%RH 3 months.	126
Table 38 One-Way ANOVA of Stability of TC MPs-loaded freeze dried patch at 40°C/75%RH 3 months.....	128



LIST OF FIGURE

	page
Figure 1 Characteristics of microsphere and microcapsule.....	3
Figure 2 Composition and sample flow of spray drying technique.....	6
Figure 3 Composition of freeze drying machine.....	7
Figure 4 Composition of freeze drying machine.....	7
Figure 5 Plant tissue culture.....	9
Figure 6 Cycle of tissue culture from explant to plant via callus induction	10
Figure 7 <i>Thunbergia laurifolia</i> leaves.....	12
Figure 8 Callus induction and culture on hard media	13
Figure 9 Structure of rosmarinic acid	15
Figure 10 Durian fruit hulls for extraction (left), polysaccharide gel extracted from durian fruit hulls (DG) (right).....	16
Figure 11 The scheme of extraction DG from durian fruit hulls [4].....	17
Figure 12 Structure of galactose, rhamnose, arabinose residues and pectin	18
Figure 13 Structure of sodium alginate.....	19
Figure 14 Calcium crosslinked of sodium alginate of MG-blocks	20
Figure 15 Egg-box model of of sodium alginate calcium crosslinking.....	20
Figure 16 Timeline of wound healing phases [44]	22
Figure 17 Pathway of reactive oxygen species that produced in inflamed tissues [16].....	23
Figure 18 Dressing patches used for wound dressing.....	24
Figure 19 Calibration curve of rosmarinic acid.....	40
Figure 20 SEM image of noncrosslinked-spray dried RA microparticles.....	44
Figure 21 SEM image of freeze dried RA microparticles	46
Figure 22 Particle size of noncrosslinked and crosslinked spray dried and freeze dried microparticles	47
Figure 23 DSC thermogram of rosmarinic acid.....	48
Figure 24 DSC thermogram of polymers, physical mixture of polymers and physical mixture of rosmarinic acid with polymer	48
Figure 25 DSC thermogram of spray dried RA microparticles	49
Figure 26 DSC thermogram of polymers, mannitol and blank crosslinked freeze-dried powders..	49
Figure 27 DSC thermogram of crosslinked-freeze dried RA particles	50
Figure 28 XRD diffractogram of noncrosslinked-spray dried RA microparticles.....	51
Figure 29 XRD diffractogram of crosslinked-spray dried RA microparticles.....	51

Figure 30 XRD diffractogram of crosslinked-freeze dried RA particles.....	52
Figure 31 FTIR spectra of rosmarinic acid, physical mixture of polymer DG and AG and physical mixture of rosmarinic acid with polymers	53
Figure 32 FTIR spectra of noncrosslinked-spray dried RA microparticles	54
Figure 33 FTIR spectra of noncrosslinked-spray dried RA microparticles	55
Figure 34 FTIR spectra of crosslinked-spray dried RA microparticles.....	56
Figure 35 FTIR spectra of crosslinked-freeze dried RA microparticles.....	57
Figure 36 FTIR spectra of crosslinked-freeze dried RA microparticles.....	57
Figure 37 FTIR spectra of microparticles made of DG1% by SD and FD process	58
Figure 38 Entrapment efficiency of encapsulated RA microparticles.....	59
Figure 39 Release profiles of noncrosslinked-spray dried RA microparticles.....	60
Figure 40 Release profiles of freeze dried RA microparticles.....	61
Figure 41 Stability study of noncrosslinked-spray dried RA microparticles.....	62
Figure 42 Stability study of crosslinked-freeze dried RA microparticles	62
Figure 43 <i>T. laurifolia</i> callus before harvesting and freeze drying process.....	63
Figure 44 <i>T. laurifolia</i> freeze dried callus (left) and <i>T. laurifolia</i> callus extract (right).....	63
Figure 45 SEM image of encapsulated TC microparticles	66
Figure 46 Particle size of encapsulated TC microparticles.....	67
Figure 47 DSC thermogram of encapsulated TC microparticles.....	68
Figure 48 XRD diffractogram of encapsulated TC microparticles	69
Figure 49 FTIR spectra of TL callus extract, TL callus extract freeze dried, spray dried and freeze dried TC microparticles	70
Figure 50 Entrapment efficiency compared between noncrosslinked-spray dried TC microparticles with crosslinked-freeze dried TC microparticles.....	71
Figure 51 <i>In vitro</i> release profiles of encapsulated TC microparticles.....	72
Figure 52 Stability study of encapsulated TC microparticles stored in 4°C.....	73
Figure 53 Stability study of encapsulated TC microparticles stored in 30°C/75%RH.....	73
Figure 54 Stability study of encapsulated TC microparticles stored in 40°C/75%RH.....	74
Figure 55 TC MPs-loaded solution in aluminium mold before freeze drying process	74
Figure 56 TC MPs-loaded freeze dried patch.....	75
Figure 57 SEM image TC MPs-loaded freeze dried patch (x150)	75
Figure 58 <i>In vitro</i> release profiles of TC MPs -loaded freeze dried patch.....	76
Figure 59 Stability study of TC MPs -loaded freeze dried patch stored at 4°C	77
Figure 60 Stability study of TC MPs -loaded freeze dried patch stored at 30°C/75%RH	78
Figure 61 Stability study of TC MPs -loaded freeze dried patch stored at 40°C/75%RH	79
Figure 62 BUCHI mini spray dryer (left) and Freeze dryer (LYOLAB) (right)	88



Figure 63 HPLC chromatogram of standard rosmarinic acid 200 µg/ml	88
Figure 64 HPLC chromatogram of entrapment of SN-1DGAG2:1	89
Figure 65 HPLC chromatogram of entrapment of FC-1DGAG2:1	90
Figure 66 HPLC chromatogram of ethanol TL callus extract.....	91
Figure 67 HPLC chromatogram of rosmarinic acid from PTC-FC-2DGAG1:1	92
Figure 68 Calibration curve of 1 st validation.....	96
Figure 69 Calibration curve of 2 nd validation.....	96
Figure 70 Calibration curve of 3 rd validation	97
Figure 71 Spray dried FA microparticles (left), freeze dried cake (right).....	99
Figure 72 TL callus(left-top row), TL callus before harvested (right-top row), TL callus before freeze drying process (left-bottom row) and freeze dried TL callus (right-bottom row).....	103
Figure 73 Encapsulated TC microparticles: TC-SN-1AG (left), TC-FC-2DGAG1:1 (right).....	103
Figure 74 HPLC chromatogram of TL callus ethanol extract (NAA1, BA2 media) (HPLC : Run at 0.9 mL/min)	104
Figure 75 HPLC chromatogram of TL callus water extract (NAA1, BA2 media).....	104
Figure 76 FTIR spectra of TL callus extract, sodium alginate and TC-SN-1AG.....	105
Figure 77 FTIR spectra of TL callus extract, mannitol and physical mixture of TL callus extract with mannitol	106
Figure 78 PTC-FC-2DGAG1:1 and packaging.....	108
Figure 79 Franz diffusion cell (left), TC MPs-loaded patch release study using Franz diffusion cell (right).....	109



LIST OF ABBREVIATIONS

RA	Rosmarinic acid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
XRD	X-Ray Powder Diffractometry
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
SEM	Scanning Electron Microscope
μm	Micrometer (s), Micron (s)
mm	Millimeter (s)
cm	Centimeter (s)
nm	Nanometer (s)
cm^{-1}	Centimeter-gram-second
RH	Relative humidity
%	Percentage
min	minute (s)
MPs	Microparticles
NAA	Alpha-Naphthaleneacetic acid
BA	6-Benzyl Aminopurine
TL	<i>Thunbergia laurifolia</i> Linn.
TC	<i>Thunbergia laurifolia</i> callus extract
TC MPs	Encapsulated TC microparticles
SD	Spray drying process

FD	Freeze drying process
SN	Noncrosslinked-spray dried microparticles
SNB	Blank noncrosslinked-spray dried microparticles
SC	Crosslinked-spray dried microparticles
FC	Crosslinked-freeze dried microparticles
AG	Sodium alginate
DG	Polysaccharide gel from durian fruit hulls
PTC	TC-loaded freeze dried patch
%EE	% Entrapment efficiency
et al.	et alli, and others

