Published Online: 14 OCT 2026

การเตรียมทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต

Preparation of Transethosome Entrapped Epigallocatechin Gallate

อรจิรา ขันธวิทย์

อีเมล: 6551701284@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กัลยาวัฒนกุล อาจารย์ที่ปรึกษา

อีเมล: mayuree@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.มัตถกา คงขาว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อีเมล: mattaka@nanotec.or.th

ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งสารตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชิน-กัลเลต ด้วยวิธีเตรียมอนุภาคแบบฉีดสารละลายเอทานอลร่วมกับการใช้เครื่องลดขนาดอนุภาคแบบใช้ความดันสูง จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมอนุภาคทรานส์เอทโธโซมเปล่าประกอบด้วยฟอสฟาติดิลโคลีน ชนิด 90G ร้อยละ 3 กรดโอเลอิก ร้อยละ 0.5 เอทานอล 95% ร้อยละ 30 และน้ำ ตำรับที่ได้มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวโปร่งแสงมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 155.10 ± 1.67 nm ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค 0.29 ± 0.01 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (-)38.26 ± 0.53 mV และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.58 ± 0.01 ส่วนทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตสามารถกักเก็บได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ซึ่งตำรับยังคงความเป็นของเหลวโปร่งแสงมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 193.97 ± 1.02 nm ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค 0.29 ± 0.00 และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (-) 38.88 ± 0.81 mV และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.65 ± 0.02 ความคงตัวของตำรับที่สภาวะการเก็บรักษา 4 ± 2 ℃ 25 ± 2 ℃ และ40 ± 2 ℃ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทั้งตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าและทรานส์เอทโธโซมที่กักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 4 ± 2 ℃ โดยตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่ามีขนาดอนุภาค 182.57 ± 1.79 nm ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเท่ากับ 0.27 ± 0.02 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (-) 37.30 ± 0.43 mV และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.35 ± 0.01 ส่วนตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโล-คาเทชินกัลเลตมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 254.77 ± 2.83 nm ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค 0.24 ± 0.00 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า(-) 39.53 ± 0.97 mV ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.39 ± 0.01 และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตร้อยละ 84.8 ± 4.4 ผลการศึกษาแสดงว่าตำรับที่พัฒนาขึ้นมีคุณลักษณะผ่านเกณฑ์

ของระบบนำส่งทางผิวหนัง ทั้งขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร ค่าการกระจายขนาดอนุภาคต่ำกว่า 0.3 ศักย์ไฟฟ้าซีต้านอกช่วง ±30 mV และประสิทธิภาพการกักเก็บในระดับสูง จึงเป็นตำรับที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยมีข้อจำกัดด้านการเก็บรักษาที่ต้องควบคุมอุณหภูมิต่ำ

คำสำคัญ: ทรานส์เอทโธโซม เอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต วิธีการเตรียมแบบฉีดสารละลายเอทานอล การลดขนาดอนุภาคแบบใช้ความดันสูง ฟอสฟาติดิลโคลีน ประสิทธิภาพการกักเก็บ

Abstract

This study aimed to develop a transethosome delivery system encapsulating Epigallocatechin gallate (EGCG) using the Ethanol injection method combined with High-pressure homogenization. The optimal formulation for blank transethosomes consisted of 3% w/w phosphatidylcholine (90G), 0.5% w/w oleic acid, 30% w/w 95% ethanol, and water. This optimized blank formulation exhibited a translucent liquid appearance with an average particle size of 155.10 ± 1.67 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.29 ± 0.01, a zeta potential of (-)38.26 ± 0.53 mV, and a pH value of 4.58 ± 0.01. The EGCG-loaded transethosomes successfully encapsulated EGCG at a concentration of 0.1% w/w, maintaining a translucent liquid appearance with a mean particle size of 193.97 ± 1.02 nm, a PDI of 0.29 ± 0.00, a zeta potential of (-)38.88 ± 0.81 mV, and a pH of 4.65 ± 0.02. Stability testing of both the blank and EGCG-loaded transethosomes was conducted at various storage conditions (4 ± 2 °C, 25 ± 2 °C, and 40 ± 2 °C) over a period of 4 weeks. The results revealed that both formulations achieved optimum stability when stored at 4 ± 2 °C. Under this low-temperature condition, the blank transethosomes exhibited a particle size of 182.57 ± 1.79 nm, a PDI of 0.27 ± 0.02, a zeta potential of (-)37.30 ± 0.43 mV, and a pH of 4.35 ± 0.01. Meanwhile, the EGCG-loaded transethosomes presented a mean particle size of 254.77 ± 2.83 nm, a PDI of 0.24 ± 0.00, a zeta potential of (-)39.53 ± 0.97 mV, a pH of 4.39 ± 0.01, and an entrapment efficiency of 84.8 ±4.4%. These findings indicate that the developed formulation meets the accepted criteria for transdermal vesicular carriers and represents a promising system for cosmetic applications, provided that it is stored under refrigerated conditions.

Keywords: Transethosome, Epigallocatechin gallate, Ethanol injection method, High-pressure homogenization, Phosphatidylcholine, Entrapment efficiency

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

ผู้บริโภคในปัจจุบันให้ความสำคัญกับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและการดูแลผิวเชิงป้องกันมากขึ้น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ชะลอความเสื่อมของผิว ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับความชุ่มชื้นและการรักษาโครงสร้างของผิวหนัง เอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต (Epigallocatechin gallate; EGCG) เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลหลักในชาเขียวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ปกป้องผิวจากรังสียูวี และยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน จึงมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม

อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดทางเคมีกายภาพของเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้ แม้เอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่น แต่เนื่องจากเป็นสารที่มีความชอบน้ำสูง (ค่า Partition coefficient; Log $P_{o/w}$ เท่ากับ 0.48) จึงมีการซึมผ่านผิวหนังชั้นสแตรตัม คอร์เนียม (Stratum corneum) ได้ต่ำ (Poor bioavailability) และเกิดการสลายตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสความร้อน ออกซิเจน และสภาวะด่าง ตามการศึกษาของ Li et al. (2013) และ Xu et al. (2019) ทำให้สารไม่สามารถออกฤทธิ์ ณ บริเวณเป้าหมายได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ดังนั้นการพัฒนาระบบนำส่งสารเพื่อปรับปรุงความคงตัวและส่งเสริมการซึมผ่านผิวหนังของเอพิกัลโลคาเทชิน-กัลเลตจึงเป็นประเด็นที่มีความสำคัญในการแก้ปัญหาดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าและตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บสารสำคัญเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตและศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของตำรับที่เตรียมได้
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตในทรานส์เอทโธโซมและประเมินความคงตัวของทรานส์เอทโธโซมที่เตรียมได้

ขอบเขตของการวิจัย

เตรียมตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ซึ่งมีองค์ประกอบของผนัง คือ ฟอสฟาติดิลโคลีน ชนิด 90G กรดโอเลอิก เอทานอล 95% และน้ำ เตรียมด้วยวิธีการฉีดสารละลายเอทานอลร่วมกับการใช้เครื่องลดขนาดอนุภาคแบบใช้ความดันสูง และศึกษาลักษณะทางเคมีกายภาพต่าง ๆ ตลอดจนประเมินประสิทธิภาพในการกักเก็บและความคงตัวทางเคมีกายภาพของตำรับทรานส์เอทโธโซม

การทบทวนวรรณกรรม

ด้านความคงตัวของสารสำคัญเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตมีสูตรโครงสร้าง $C_{22}H_{18}O_{11}$ น้ำหนักมวลโมเลกุล 458.37 g/mole ลักษณะเป็นผงสีขาว-ชมพูอ่อน จุดหลอมเหลว 218°C คุณสมบัติการละลายสามารถละลายในน้ำ (ใส ไม่มีสี เมื่อละลายที่ความเข้มข้น 5 mg/ml) ตามการศึกษาของ Zuo et al. (2002) สามารถเกิดการสลายตัวผ่านสามกลไกหลัก ได้แก่ ปฏิกิริยาเอพิเมอไรเซชันเป็น Gallocatechin gallate

(GCG) การแตกพันธะเอสเทอร์ได้ Epigallocatechin (EGC) และกรดแกลลิก และปฏิกิริยาออกซิเดชันร่วมกับการเกิดพอลิเมอร์ซึ่งทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองถึงส้ม ตามการศึกษาของ Li et al. (2013) ซึ่งอัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิและค่ากรด-ด่างที่สูงขึ้น โดยสารกลุ่มคาเทชินมีความคงตัวดีกว่าในสภาวะกรดอ่อน ตามการศึกษาของ Theppakorn (2013) และ Xu et al. (2019) ข้อมูลนี้ชี้ว่าระบบนำส่งที่เหมาะสมต้องทั้งปกป้องสารและรักษาค่ากรด-ด่างของตำรับให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

ด้านระบบนำส่ง ทรานส์เอทโธโซมจัดเป็นเวสิเคิลที่มีความยืดหยุ่นสูง (Ultra-deformable vesicles) ซึ่งผสานข้อดีของเอทโธโซมและทรานส์เฟอร์โซมไว้ด้วยกัน ความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของระบบนี้มีที่มาจากองค์ประกอบสองส่วนที่ทำงานเสริมกัน ส่วนแรกคือเอทานอลความเข้มข้นสูงในช่วงร้อยละ 20–40 ซึ่ง Touitou et al. (2000) รายงานว่าสามารถแทรกตัวเข้าไปในชั้นไขมันของผนังเวสิเคิล ทำให้ชั้นลิพิดมีความเป็นของไหล (Lipid fluidity) สูงขึ้น ในขณะเดียวกันเอทานอลที่ถูกนำพาไปสู่ผิวหนังยังรบกวนการจัดเรียงตัวของลิพิดระหว่างเซลล์ในชั้นสแตรตัมคอร์เนียม ส่งผลให้ความต้านทานต่อการซึมผ่านลดลง อีกส่วนหนึ่งคือสารเพิ่มความยืดหยุ่น (Edge activator) ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลรูปกรวย โดย Cevc et al. (1998) อธิบายว่าโครงสร้างดังกล่าวช่วยลดแรงตึงบริเวณขอบของชั้นไขมันสองชั้น เวสิเคิลจึงเปลี่ยนรูปและแทรกผ่านช่องว่างที่มีขนาดเล็กกว่าตัวอนุภาคเองได้โดยไม่แตกสลาย นอกเหนือจากการส่งเสริมการซึมผ่านแล้ว โครงสร้างของทรานส์เอทโธโซมยังเอื้อต่อการปกป้องสารสำคัญ โดย Chowdary et al. (2023) อธิบายว่าชั้นไขมันสองชั้นทำหน้าที่เสมือนเกราะกั้นทางกายภาพระหว่างสารสำคัญซึ่งบรรจุอยู่ในแกนกลางชั้นน้ำกับออกซิเจนและตัวกลางภายนอก โอกาสการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงลดลง ประกอบกับสารที่ถูกกักเก็บอยู่ในสภาพแวดล้อมจุลภาคภายในเวสิเคิลที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างคงที่ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะกับสารกลุ่มคาเทชินที่คงตัวได้ดีในภาวะกรดอ่อน แม้กระนั้น การออกแบบตำรับยังต้องคำนึงถึงสมดุลระหว่างปริมาณสารเพิ่มความยืดหยุ่นกับสัดส่วนฟอสโฟลิพิด เนื่องจาก Kumar et al. (2018) ระบุว่าการใช้กรดโอเลอิกเกินระดับที่เหมาะสมจะรบกวนการจัดเรียงตัวของชั้นไขมันสองชั้น จนทำให้เวสิเคิลรวมตัวกันเป็นอนุภาคขนาดใหญ่และเกิดการตกตะกอนในที่สุด

เมื่อพิจารณาการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการนำทรานส์เอทโธโซมมาใช้กับสารกลุ่มคาเทชินมีรายงานไว้โดย Anwar et al. (2018) ซึ่งเตรียมอนุภาคด้วยวิธีทำให้เกิดแผ่นฟิล์มบางจากสารสกัดใบชาเขียว และใช้ Span 80 เป็นสารเพิ่มความยืดหยุ่น ได้ประสิทธิภาพการกักเก็บร้อยละ 45.26 ± 8.15 ส่วนการใช้วิธีฉีดสารละลายเอทานอลนั้นมีรายงานในการกักเก็บสารสกัดจากธรรมชาติชนิดอื่น ดังการศึกษาของ Hassan et al. (2023) และ Kaur et al. (2018) ขณะที่การลดขนาดด้วยเครื่องลดขนาดอนุภาคแบบใช้ความดันสูงปรากฏในงานของ Soni et al. (2020) ซึ่งศึกษากับอนุภาคพอลิเมอร์ และและพบว่าช่วยลดขนาดอนุภาคและเพิ่มความสม่ำเสมอของการกระจายขนาดได้ การผสมผสานทั้งสองวิธีจึงมีแนวโน้มให้อนุภาคที่มีคุณภาพตามเกณฑ์ที่ใช้กันทั่วไป กล่าวคือขนาดอนุภาคไม่เกิน 200 nm ซึ่งเหมาะต่อการซึมผ่านสู่ผิวหนังชั้นลึก และค่า PDI ไม่เกิน 0.3 ซึ่งบ่งชี้ความเป็นเนื้อเดียวกันของตำรับ ตามที่ Chowdary et al. (2023) เสนอไว้

นอกจากนี้ Mohanraj and Chen (2007) ยังระบุว่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่อยู่นอกช่วง ±30 mV เพียงพอต่อการเกิดแรงผลักระหว่างอนุภาคและช่วยป้องกันการจับตัวเป็นก้อน อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานที่นำสองวิธีดังกล่าวมาใช้ร่วมกันสำหรับการกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตบริสุทธิ์โดยใช้กรดโอเลอิกเป็นสารเพิ่มความยืดหยุ่น งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผสมผสานวิธีการเตรียมดังกล่าว ควบคู่ไปกับการหาขีดจำกัดความเข้มข้นของสารสำคัญที่ระบบรองรับได้และสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสม อันเป็นประเด็นที่การศึกษาก่อนหน้ายังมิได้รายงานไว้ ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยนี้จึงนำเกณฑ์ดังกล่าวมาใช้ทั้งในการคัดเลือกตำรับและการอภิปรายผล

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การเตรียมทรานส์เอทโธโซมเปล่าด้วยวิธี Ethanol injection method โดยละลายฟอส-ฟาติดิลโคลีน 90G และกรดโอเลอิกในเอทานอล 95% แล้วหยดลงในน้ำปราศจากไอออนด้วยอัตรา 300 µL/min ขณะปั่นกวนด้วย Magnetic stirrer ที่ 1,800 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น Vortex 5 นาที และลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง High-pressure homogenizer ที่ 5,000 psi จำนวน 3 รอบ (ดัดแปลงจาก Hassan et al. 2023) องค์ประกอบของตำรับแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สัดส่วนองค์ประกอบในการเตรียมทรานส์เอทโธโซมเปล่าด้วยวิธี Ethanol injection method

Formulation	Phospholipid (mg)	Oleic acid (mg)	Ethanol (g)	DI water (g)
TRE-1	300	50	3	7
TRE-2	300	100	3	7
TRE-3	300	150	3	7

2. การประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของทรานส์เอทโธโซมเปล่า ด้วยการสังเกตสี ความขุ่น การตกตะกอน และการแยกชั้น จากนั้นวัดขนาดอนุภาคและค่าการกระจายขนาดอนุภาค (PDI) ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering (DLS) พร้อมทั้งวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า โดยเจือจางตัวอย่าง 0.05 mL ด้วยน้ำ 0.95 mL และวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 0.5 °C ทำซ้ำ 3 ครั้ง ซึ่งดัดแปลงวิธีมาจาก Hassan et al. (2023) นอกจากนี้ยังวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับโดยไม่เจือจางด้วยเครื่อง pH meter

3. การประเมินความคงตัวของตำรับของทรานส์เอทโธโซมเปล่าโดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 2 °C (ในตู้เย็น) 25 ± 2 °C (ห้องควบคุมอุณหภูมิ) และ 40 ± 2 °C (ตู้อบลมร้อน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Eaknai et al., 2022) หลังจากครบตามสภาวะการเก็บข้างต้น นำมาศึกษาลักษณะทางเคมีกายภาพของทรานส์เอทโธโซมเปล่าเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้นเพื่อคัดเลือกตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าที่มีความคงตัวอย่างน้อย 1 ตำรับ สำหรับกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกทรานส์-เอทโธโซมเปล่าได้แก่ ขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วง 5–200 nm และการกระจายของขนาดอนุภาคไม่เกิน 0.3 ตามเกณฑ์ที่ Chowdary et al. (2023) เสนอไว้ ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าอยู่นอกช่วง +30 ถึง -30 mV ตามที่ Mohanraj

and Chen (2007) ระบุว่าเพียงพอต่อการเกิดแรงผลักระหว่างอนุภาค และระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมอนุภาค

4. การเตรียมทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ด้วยวิธี Ethanol injection method คัดเลือกตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าที่มีความคงตัว เพื่อกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต จากนั้นนำมาเตรียมทรานส์เอทโธโซมเพื่อบรรจุสารสำคัญเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 2.0, 3.0% w/w ของตำรับทรานส์เอทโธโซม ลงใน Aqueous phase ของตำรับที่คัดเลือกได้ จากนั้นดำเนินการตามวิธีในหัวข้อที่ 1 ซึ่งดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Anwar et al. (2018) และ Ramadon et al. (2017) แล้วประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพตามหัวข้อที่ 2

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคทรานส์เอทโธโซมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) ศึกษาโครงสร้างและลักษณะอนุภาคของตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าและตำรับกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) ที่ Accelerating voltage 80 kV โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Negative staining ย้อมด้วย UranyLess ตามหลักการของ Chescoe and Goodhew (1990)

6. การศึกษาการกักเก็บสารสำคัญในอนุภาคทรานส์เอทโธโซม % Loading capacity และ % Entrapment efficiency แยกเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตอิสระออกจากอนุภาคด้วยวิธี Centrifugal ultrafiltration โดยปั่นเหวี่ยงตัวอย่างปริมาตร 1.0 mL ผ่านหลอดกรองที่มีขนาดรูกรอง 100 kDa ที่ความเร็วรอบ 5,000 g อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นดูดส่วนอนุภาคที่ค้างอยู่บนเมมเบรนปริมาตร 100 µL มาทำลายโครงสร้างอนุภาคด้วย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 100 µL ร่วมกับน้ำ 800 µL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งดัดแปลงวิธีมาจาก MilliporeSigma (n.d.) ต่อมานำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตด้วยเครื่อง Microplate reader โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 7.8125–125 µg/mL ซึ่งมีสมการ $y = 0.0046x - 0.0235$ ($R^2 = 0.9998$) แล้วคำนวณร้อยละความสามารถในการบรรจุและร้อยละประสิทธิภาพการกักเก็บตามสมการที่ (1) และ (2) ซึ่งดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Subongkot et al. (2021) และ Azizah et al. (2017) ตามลำดับ

$$\text{Loading capacity (\%)} = \frac{EGCG_{TT} \times 100}{TRE_T} \quad (1)$$

โดย $EGCG_{TT}$ คือ ปริมาณของ EGCG ที่ถูกบรรจุในทรานส์เอทโธโซม

TRE_T คือ ปริมาณของ Phosphatidylcholine และ Oleic acid ในทรานส์เอทโธโซม

$$\text{Entrapment efficiency (\%)} = \frac{EGCG_{TT} \times 100}{EGCG_{T}} \quad (2)$$

โดย $EGCG_{TT}$ คือ ปริมาณของ EGCG ที่ถูกบรรจุในทรานส์เอทโธโซม

$EGCG_{T}$ คือ ปริมาณ EGCG ทั้งหมดที่เติมลงในทรานส์เอทโธโซม

7. การประเมินความคงตัวของตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตโดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 2 ℃ (ในตู้เย็น), 25 ± 2 ℃ และ 40 ± 2 ℃ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ อ้างอิงจาก Eaknai et al. (2022) หลังจากครบตามสภาวะการเก็บข้างต้น นำมาศึกษาลักษณะทางเคมีกายภาพของทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต เปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ได้แก่ ลักษณะปรากฏ ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายขนาด ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และ %Entrapment efficiency (%EE) เปรียบเทียบกับเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตที่ไม่ได้กักเก็บ (Unencapsulated EGCG) ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้สภาวะเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 ℃, 25 ± 2 ℃ และ 40 ± 2 ℃

8. รวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง รวบรวมข้อมูลผลการทดลองทั้งหมดนำมาประมวลผลและวิเคราะห์ทางสถิติ โดยแสดงค่าเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ (n = 3) และทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติ ใช้ Non-Parametric ตามด้วย Wilcoxon-Signed-Rank Test โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ P-value ต่ำกว่า 0.05

ผลวิจัย (Results)

1. ผลการเตรียมทรานส์เอทโธโซมเปล่าด้วยวิธี Ethanol Injection Method

ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพ ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคศักย์ไฟฟ้าซีต้า และค่า pH ของตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าที่เตรียมด้วยวิธี Ethanol injection method

Formulation	ลักษณะทางกายภาพ	Cycle of high pressure homogenizer	Particle size (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)	pH value
TRE-1(0)	ของเหลวโปร่งแสง	0	308 ± 5.89	0.31 ± 0.01	(-)35.03 ± 1.35	4.56 ± 0.02
TRE-1(3)	ของเหลวโปร่งแสง	3	155.10 ± 1.67	0.29 ± 0.01	(-)38.26 ± 0.53	4.58 ± 0.01
TRE-2(0)	สารแขวนลอยที่มีตะกอนสีขาวขุ่นหลังทิ้งไว้ 30 นาทีเกิดการแยกชั้นของตำรับ	0	-	-	-	-
TRE-3(0)	สารแขวนลอยที่มี ตะกอนสีขาวขุ่นหลังทิ้งไว้ 15 นาทีเกิดการแยกชั้นของตำรับ	0	-	-	-	-

หมายเหตุ Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3)

จากการประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพและความคงตัวของตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าที่เตรียมด้วยวิธี Ethanol injection method ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 1 พบว่า ตำรับ TRE-2 และ TRE-3



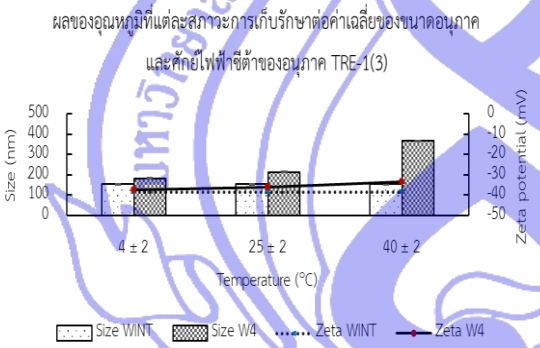
TRE-1(0) TRE-1(3) TRE-2(0) TRE-3(0)

ภาพที่ 1 ตำรับทรานส์เอทโธโซมเปล่าที่เตรียมด้วยวิธี Ethanol injection method

TRE-3 ซึ่งมีกรดโอเลอิกสูงขึ้น เกิดการตกตะกอนและแยกชั้นภายใน 30 และ 15 นาทีตามลำดับ จึงไม่นำมาวิเคราะห์ต่อ ส่วนตำรับ TRE-1 เป็นของเหลวโปร่งแสงเนื้อเดียวกัน ก่อนลดขนาด (TRE-1(0)) มีขนาดเฉลี่ยของอนุภาค 308 ± 5.89 nm และ PDI 0.31 ± 0.01 หลังผ่านเครื่อง High-pressure homogenizer จำนวน 3 รอบ (TRE-1(3)) ขนาดอนุภาคลดลงเหลือ 155.10 ± 1.67 nm, PDI 0.29 ± 0.01 ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (-)38.26 ± 0.53 mV และ pH 4.58 ± 0.01 (ตารางที่ 2) ตำรับ TRE-1(3) ผ่านเกณฑ์ทุกข้อ จึงถูกคัดเลือกเพื่อกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต

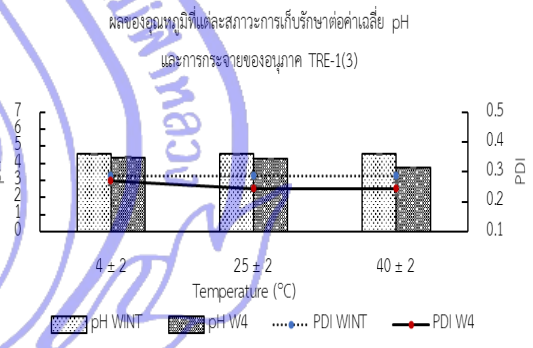
2. ผลการประเมินความคงตัวของตำรับของทรานส์เอทโธโซมเปล่า หลังเก็บรักษา 4 สัปดาห์

ตำรับ TRE-1(3) ยังคงเป็นของเหลวโปร่งแสงในทุกสภาวะ ไม่พบการตกตะกอนหรือแยกชั้น ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ โดยที่ 4±2, 25 ± 2 และ 40 ± 2 ℃ มีขนาด 182.57 ± 1.79, 213.97 ± 2.06 และ 368.63 ± 0.65 nm ตามลำดับ ค่า PDI ทุกสภาวะอยู่ในช่วง 0.24–0.27 และศักย์ไฟฟ้าซีต้าอยู่ในช่วง (-)33.38 ถึง (-)37.30 mV ค่ากรด-ด่างลดลงจาก 4.58 ± 0.01 เป็น 4.35 ± 0.01, 4.25 ± 0.01 และ 3.73 ± 0.01 ตามลำดับ (ภาพที่ 2 และ 3) สภาวะ 4 ± 2 ℃ จึงมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด



หมายเหตุ Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันของการเก็บรักษาต่อค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคทรานส์เอทโธโซมเปล่า TRE-1(3) หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์



หมายเหตุ Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

ภาพที่ 3. ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันของการเก็บรักษาต่อค่าเฉลี่ย pH และการกระจายของอนุภาคทรานส์เอทโธโซมเปล่า TRE-1(3) หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3. ผลการเตรียมทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ด้วยวิธี Ethanol Injection Method

ลักษณะปรากฏทางกายภาพของตำรับทรานส์เอทโธโซม ที่กักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตสูตร TRE-1 เตรียมได้ด้วยวิธี Ethanol injection method ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าตำรับที่กักเก็บเอพิกัลโล-คาเทชินกัลเลต ร้อยละ 0.1 เป็นความเข้มข้นเดียวที่ได้ของเหลวโปร่งแสงสีอมเหลืองอ่อนเนื้อเดียวกัน ขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2–0.5 เป็นของเหลวสีขาวขุ่นและตกตะกอนภายใน 1–24 ชั่วโมง และที่ร้อยละ

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพ ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคและ ศักย์ไฟฟ้าซีต้า ของตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 2.0 และ 3.0 %w/w ที่เตรียมได้ด้วยวิธี Ethanol Injection method

สัปดาห์ที่	อุณหภูมิ (°C)	0.1%w/w EGCG-TRE-1(3)	0.1%w/w EGCG Solution
0	อุณหภูมิห้อง	ของเหลวโปร่งแสง มีสีอมเหลืองอ่อน	ของเหลวใส ไม่มีสี
4	4±2	ของเหลวโปร่งแสง สีเหลืองอ่อน	ของเหลวใส เหลืองอ่อน
4	25±2	ของเหลวโปร่งแสง สีเหลืองอ่อน	ของเหลวใส เหลืองอ่อน
4	40±2	ของเหลวโปร่งแสง สีอมเหลือง	ของเหลวใส ส้มเหลืองเข้ม

2.0–3.0 เกิดการแยกชั้นทันที (ตารางที่ 3) แม้ตำรับร้อยละ 0.2 และ 0.25 ที่ผ่านการลดขนาดจะมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 205.7–254.17 nm แต่ค่า PDI สูงถึง 0.52–0.60 แสดงถึงการกระจายขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ ส่วนตำรับ 0.1%EGCG-TRE-1(3) มีขนาดเฉลี่ยของอนุภาคลดลงจาก 325.5 ± 9.23 nm เหลือ 193.97 ± 1.02 nm, PDI 0.29 ± 0.00 ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (-)38.88 ± 0.81 mV และ pH 4.65 ± 0.02 ซึ่งผ่านเกณฑ์ทุกข้อ

4. ผลการประเมินความคงตัวของตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ที่ความเข้มข้น 0.1%EGCG-TRE-1(3) และสารละลายทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตที่ไม่ได้ถูกกักเก็บที่ความเข้มข้น 0.1%w/w ที่สัปดาห์ที่ 0 และ 4 ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างๆ

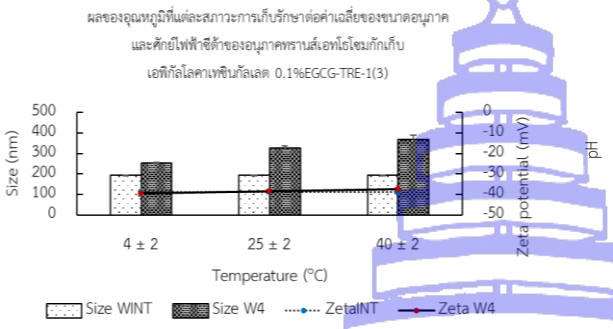
Formulation	ลักษณะทางกายภาพ	Cycle of high pressure homogenizer	Particle size (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)	pH value
0.1%EGCG-TRE-1(0)	ของเหลวโปร่งแสง มีสีอมเหลืองอ่อน	0	325.5 ± 9.23	0.30 ± 0.02	(-)40.62 ±1.19	4.37 ± 0.02
0.1%EGCG-TRE-1(3)	ของเหลวโปร่งแสง มีสีอมเหลืองอ่อน	3	193.97 ± 1.02	0.29 ± 0.00	(-)38.88 ± 0.81	4.65 ± 0.02
0.2%EGCG-TRE-1(0)	ของเหลวสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ 24 hr ตกตะกอนสีเหลืองอ่อนๆ	0	397.5 ± 9.88	0.31 ± 0.04	(-)41.90 ± 0.66	4.41 ± 0.02
0.2%EGCG-TRE-1(3)	ของเหลวสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ 24 hr ตกตะกอนสีเหลืองอ่อนๆ	3	205.7 ± 9.1	0.60 ± 0.10	(-)40.98 ± 0.48	4.51 ± 0.02
0.25%EGCG-TRE-1(0)	ของเหลวสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ 24 hr ตกตะกอนสีเหลืองอ่อนๆ	0	409.1 ± 5.30	0.44 ± 0.07	(-)44.25 ± 1.93	4.37 ± 0.02
0.25%EGCG-TRE-1(3)	ของเหลวสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ 24 hr ตกตะกอนสีเหลืองอ่อนๆ	3	254.17 ± 1.95	0.52 ± 0.01	(-)41.47 ± 0.75	4.65 ± 0.02
0.5%EGCG-TRE-1(0)	ของเหลวสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ 1 hr ตกตะกอนสีเหลืองอ่อนๆ	0	-	-	-	-
2.0%EGCG-TRE-1(0)	ตำรับแยกชั้น	0	-	-	-	-
3.0%EGCG-TRE-1(0)	ตำรับแยกชั้น	0	-	-	-	-

หมายเหตุ Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).



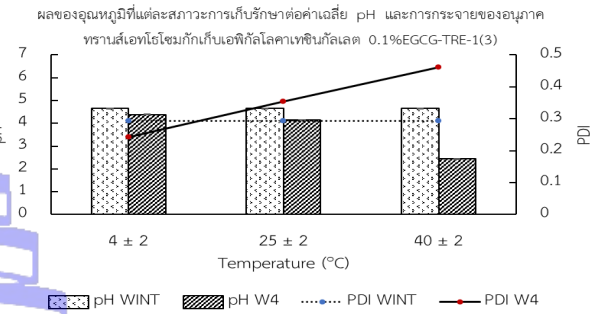
สัปดาห์ที่ 0 สัปดาห์ที่ 4 (4 ± 2 ℃) สัปดาห์ที่ 4 (25 ± 2 ℃) สัปดาห์ที่ 4 (40 ± 2 ℃)

ภาพที่ 4 ตำรับทรานส์เอทโธโซมที่กักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต 0.1%EGCG-TRE-1(3) ที่สัปดาห์ที่ 0 และ 4 ที่สภาวะการเก็บรักษา 4 ± 2 ℃, 25 ± 2 ℃ และ 40 ± 2 ℃



หมายเหตุ Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

ภาพที่ 5 ผลของอุณหภูมิที่แต่ละสภาวะการเก็บรักษาต่อค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต 0.1%EGCG-TRE-1(3) หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์



หมายเหตุ Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิที่แต่ละสภาวะการเก็บรักษาต่อค่าเฉลี่ย pH และการกระจายของอนุภาคทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต 0.1%EGCG-TRE-1(3) หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

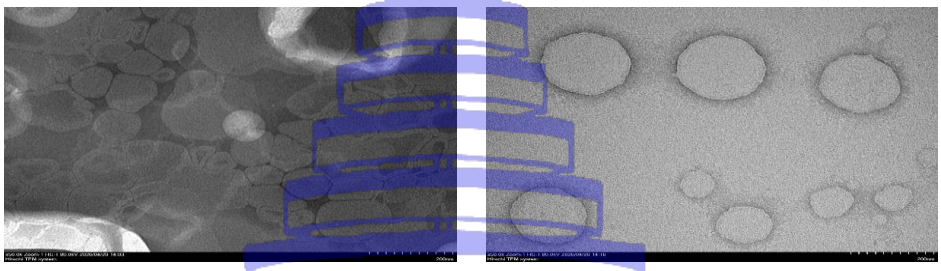
ผลการประเมนความคงตวของตารบของทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตพบว่าสารละลายเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตอิสระเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองอ่อนที่ 4 ± 2 และ 25 ± 2 ℃ และเปลี่ยนเป็นสีส้มเหลืองเข้มอย่างชัดเจนที่ 40 ± 2 ℃ ขณะที่ตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต มีการเปลี่ยนสีน้อยกว่าในทุกสภาวะ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4) ด้านคุณลักษณะทางกายภาพขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ ที่ 4 ± 2 ℃ มีขนาด 254.77 ± 2.83 nm, PDI 0.24 ± 0.00 ที่ 25 ± 2 ℃ มีขนาด 328.0 ± 9.43 nm, PDI 0.35 ± 0.03 และที่ 40 ± 2 ℃ มีขนาด 368.4 ± 22.54 nm, PDI 0.38 ± 0.02 ศักย์ไฟฟ้าซีต้าทุกสภาวะอยู่ในช่วง (-)37.25 ถึง (-)39.53 mV ค่ากรด-ด่างลดลงจาก 4.65 ± 0.02 เป็น 4.39 ± 0.01,4.14 ± 0.01 และ 2.43 ± 0.01 ตามลำดับ (ภาพที่ 5 และ 6) อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์เฉพาะตำรับที่เก็บรักษาที่ 4±2 ℃ พบว่าคุณลักษณะทั้งสี่ประการที่สัปดาห์ที่ 4 ไม่แตกต่างจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.109, 0.102, 0.285$ และ 0.102 ตามลำดับ) ซึ่งสนับสนุนว่าสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำช่วยรักษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของตำรับไว้ได้

ดังนั้นตำรับทรานส์เอทโธโซมกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต มีความคงตัวดีที่สุดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 2 ℃ นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตอิสระที่เปลี่ยนเป็นสีส้มเหลืองเข้มที่ 40 ± 2 ℃ พบว่าตำรับทรานส์เอทโธโซมมีการเปลี่ยนสีน้อยกว่าในทุกสภาวะ เมื่อพิจารณาร่วมกันทั้งสามตัวชี้วัด ได้แก่ การเปลี่ยนสีที่น้อยกว่า การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างที่น้อยกว่า และประสิทธิภาพการกักเก็บที่คงอยู่ที่ร้อยละ 84.8 ± 4.4 หลังเก็บรักษาที่ 4±2 ℃ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้นที่ร้อยละ 84.5 ± 1.4 แสดงให้เห็นว่าการกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตไว้ในอนุภาค

ช่วยชะลอการสลายตัวของเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ส่วนการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างสะท้อนการเกิดกรดแกลลิกจากการแตกพันธะเอสเทอร์ จึงใช้ทั้งสองตัวชี้วัดประกอบกันในการประเมิน

5. ลักษณะภายในและภายนอกของอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) ที่ Accelerating voltage 80.0 kV, เตรียมตัวอย่างด้วย Negative staining โดยย้อมด้วย UranyLess ดังแสดงในภาพที่ 7 โดย ภาพที่ 7(A) คือ ตัวอย่างของ TRE-1(3) และ 7(B) คือ ตัวอย่างของ 0.1%EGCG-TRE-1(3) ที่กำลังขยาย x50.0k, Scale bar 200 nm



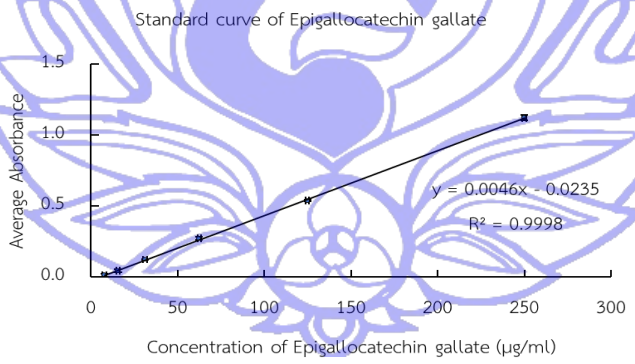
(A) (B)

ภาพที่ 7 ภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM)

ภาพจาก TEM แสดงว่าอนุภาคของตำรับเปล่า TRE-1(3) มีรูปร่างทรงกลมปนรูปร่างไม่สม่ำเสมอ และมีผนังสองชั้นซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของฟอสโฟลิพิด (ภาพที่ 7A) ส่วนตำรับ 0.1%EGCG-TRE-1(3) มีอนุภาคทรงกลมผนังสองชั้น กระจายตัวสม่ำเสมอ และมีขนาดประมาณ 120–200 nm (ภาพที่ 7B) ซึ่งเล็กกว่าค่าที่วัดด้วย DLS เล็กน้อย

6. ผลการประเมินความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญในอนุภาคทรานส์เอทโธโซม

% Loading Capacity และ % Entrapment Efficiency



ภาพที่ 8 กราฟมาตรฐานของเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตในช่วงความเข้มข้น 7.8125 - 125 µg/ml

จากกราฟจะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกรดเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตกับ Average Absorbance เป็น y = 0.0046x - 0.0235 (R^2 = 0.9998) จากการวิเคราะห์ปริมาณเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตที่ถูกกักเก็บ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 8) พบว่าตำรับ 0.1%EGCG-TRE-1(3)

มีร้อยละความสามารถในการบรรจุ (% Loading capacity) เท่ากับ 2.3 ± 0.04 และมีร้อยละประสิทธิภาพการกักเก็บ (% Entrapment efficiency) ที่สัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ 84.5 ± 1.4 ส่วนที่สัปดาห์ที่ 4 ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่ 4±2 °C เท่ากับ 84.8 ± 4.4

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

1.การอภิปรายผล

ผลตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 1 ด้านการเตรียมตำรับและสมบัติทางเคมีกายภาพ แสดงว่าสัดส่วนกรดโอเลอิกเป็นปัจจัยวิกฤตต่อความคงตัวของตำรับเปล่า การเพิ่มกรดโอเลอิกจาก 50 เป็น 100 และ 150 mg โดยไม่เพิ่มฟอสโฟลิพิดทำให้ตำรับตกตะกอนเร็วขึ้นตามลำดับ สอดคล้องกับ Kumar et al. (2018) ที่ระบุว่ากรดไขมันอิสระที่เกินระดับเหมาะสมจะรบกวนชั้นไขมันสองชั้นจนเวสิเคิลรวมตัวและตกตะกอน นอกจากนี้ การลดขนาดด้วยความดันสูง 3 รอบ ช่วยลดขนาดอนุภาคลงประมาณครึ่งหนึ่ง พร้อมกับลดค่า PDI สอดคล้องกับ Soni et al. (2020) ทำให้ได้อนุภาคขนาดต่ำกว่า 200 nm ที่เหมาะต่อการซึมผ่านชั้นสแตรตัมคอร์เนียม ในด้านความเข้มข้นของสารสำคัญที่ระบบรองรับได้ พบว่าตำรับรองรับเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตได้สูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น ค่า PDI เพิ่มขึ้นเกิน 0.3 และตำรับเกิดการตกตะกอน ซึ่งบ่งชี้ว่าปริมาณเอพิกัลโล-คาเทชินกัลเลตเกินความจุที่อนุภาครองรับได้ ส่วนขนาดอนุภาคที่วัดได้จาก TEM ซึ่งเล็กกว่าค่าจาก DLS นั้น เป็นผลจากความแตกต่างของหลักการวัด เนื่องจาก DLS วัดขนาดอุทกพลศาสตร์ที่รวมชั้นตัวทำละลายรอบอนุภาค ขณะที่ TEM วัดตัวอย่างแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศซึ่งอนุภาคเกิดการหดตัว ตามที่ Danaei et al. (2018) รายงานไว้

ผลตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 2 ด้านประสิทธิภาพการกักเก็บและความคงตัว พบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บที่ร้อยละ 84.5 ± 1.4 นับว่าอยู่ในระดับสูงสำหรับสารที่มีความชอบน้ำ ซึ่งอธิบายได้ด้วยการศึกษาของ Chowdary et al. (2023) ที่ว่าโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด เอทานอล และสารเพิ่มความยืดหยุ่นร่วมกัน ทำให้ผนังอนุภาคมีความยืดหยุ่นและรองรับสารสำคัญได้ดี ในด้านความคงตัวนั้น อุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อตำรับ โดยที่อุณหภูมิ 4 ± 2 °C ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด คือร้อยละ 17.7 ± 1.6 ในตำรับเปล่า และร้อยละ 31.3 ± 1.5 ในตำรับกักเก็บเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ในขณะที่อุณหภูมิ 40 ± 2 °C ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 137.7 ± 0.4 และร้อยละ 89.9 ± 11.6 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Kaur et al. (2018) ที่พบว่าอัตราการรวมตัวของอนุภาคเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เมื่อพิจารณาตัวอย่างทุกสภาวะรวมกัน ขนาดอนุภาคที่สัปดาห์ที่ 4 เพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.008$) แต่เมื่อจำกัดการวิเคราะห์เฉพาะสภาวะ 4±2 °C กลับไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.109$) แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคที่ตรวจพบในภาพรวมมีที่มาจากสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่าเป็นสำคัญ อย่างไรก็ตาม แม้ขนาดอนุภาคที่ 4 ± 2 °C จะเกินเกณฑ์ 200 nm ที่ใช้ในการคัดเลือกตำรับ แต่ยังคงต่ำกว่า 500 nm ซึ่ง Al-Kassas et al. (2016) ระบุว่ายังสามารถซึมผ่านสู่ผิวหนังชั้นลึกได้

ประกอบกับศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่คงอยู่นอกช่วง ±30 mV ในทุกสภาวะ จึงช่วยป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของอนุภาคตามที่ Mohanraj and Chen (2007) อธิบายไว้ ในด้านการเปลี่ยนแปลงทางเคมี การลดลงของค่ากรด-ด่างอย่างมากที่ 40 ± 2 ℃ (ลดลงร้อยละ 47.9 ± 0.1) ร่วมกับการเปลี่ยนสีเป็นเหลืองส้ม สอดคล้องกับกลไกการสลายตัวของเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต ที่ Li et al. (2013) รายงานไว้ ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การแตกพันธะเอสเทอร์ซึ่งให้กรดแกลลิก และปฏิกิริยาเอพิเมอไรเซชัน โดย Xu et al. (2019) พบว่าปฏิกิริยาเหล่านี้ถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ในทางตรงกันข้าม ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 ℃ ค่ากรด-ด่างของตำรับยังคงอยู่ในช่วง 4–8 ซึ่ง Theppakorn (2013) ระบุว่าเหมาะสมต่อความคงตัวของสารกลุ่มคาเทชิน และสีของตำรับเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย สอดคล้องกับการศึกษาของ Ramadon et al. (2017) นอกจากนี้ การที่ตำรับทรานส์เอทโธโซมเปลี่ยนสีน้อยกว่าสารละลายเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตอิสระในทุกสภาวะ ยังบ่งชี้ว่าการกักเก็บสารไว้ในอนุภาคช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งอธิบายได้จากกลไกที่ Chowdary et al. (2023) เสนอไว้ว่าชั้นไขมันสองชั้นของเวสิเคิลทำหน้าที่เป็นเกราะกั้นทางกายภาพระหว่างสารสำคัญกับออกซิเจนในตัวกลางภายนอก จึงลดอัตราการเกิดออกซิเดชันลง สอดคล้องกับ Eaknai et al. (2022) ที่พบว่าการกักเก็บสารสกัดจากธรรมชาติในอนุภาคนาโนช่วยรักษาฤทธิ์ของสารไว้ได้ดีกว่าสารอิสระภายหลังการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม การชะลอดังกล่าวเป็นเพียงบางส่วน เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับยังคงลดลงในทุกสภาวะ แสดงว่าการสลายตัวยังคงดำเนินอยู่แม้ในอัตราที่ช้ากว่า

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดด้านการวิเคราะห์ปริมาณสาร เนื่องจากการวัดด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ขาดความจำเพาะเจาะจง โดย Snitsarev et al. (2013) และ Pires et al. (2025) รายงานว่าเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลต และสารสลายตัว ได้แก่ GCG, EGC และกรดแกลลิก มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 270–280 nm ซึ่งทับซ้อนกัน ค่าที่วัดได้จึงเป็นผลรวมของสารสำคัญกับสารสลายตัวที่ยังคงอยู่ภายในอนุภาค ด้วยเหตุนี้ ค่าประสิทธิภาพการกักเก็บที่สัปดาห์ที่ 0 ซึ่งเท่ากับร้อยละ 84.5 ± 1.4 ถือว่าสะท้อนปริมาณเอพิกัลโลคาเทชินกัลเลตได้ใกล้เคียงความจริง เนื่องจากยังไม่เกิดการสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าที่สัปดาห์ที่ 4 ซึ่งเท่ากับร้อยละ 84.8 ± 4.4 ควรตีความว่าเป็นความสามารถของอนุภาคในการกักเก็บโมเลกุลไว้ภายใน (Physical retention) มากกว่าจะเป็นหลักฐานยืนยันว่าสารสำคัญยังคงอยู่ในรูปเดิมทั้งหมด ข้อสรุปเรื่องการชะลอการสลายตัวในงานวิจัยนี้จึงอาศัยหลักฐานประกอบจากการเปลี่ยนสีและการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างร่วมด้วย และการยืนยันในเชิงปริมาณจำเป็นต้องใช้เทคนิค HPLC-DAD ซึ่งแยกสารสำคัญออกจากสารสลายตัวได้ นอกจากนี้ ระยะเวลาทดสอบความคงตัวเพียง 4 สัปดาห์ยังสั้นเกินกว่าจะใช้ประเมินอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้ ทั้งนี้การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองและค่า Deformability index เพื่อยืนยันคุณสมบัติเฉพาะของทรานส์เอทโธโซม และทดสอบความคงตัวเป็น 3-6 เดือน เพื่อให้ประมาณอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้

รายการอ้างอิง

Al-Kassas, R., Wen, J., Cheng, A. E. M., Kim, A. M. J., Liu, S. S. M., & Yu, J. (2016). Transdermal delivery of propranolol hydrochloride through chitosan nanoparticles dispersed in mucoadhesive gel. *Carbohydrate Polymers, 153*, 176–186.

Anwar, E., Ramadon, D., & Ardi, G. (2018). Novel transethosome containing green tea(*Camellia sinensis* L. kuntze) leaf extract for enhanced skin delivery of epigallocatechin gallate: formulation and *in vitro* penetration test. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *10*, 299.

Azizah, N., Sagita, E., & Iskandarsyah, I. (2017). In vitro penetration tests of transethosome gel preparations containing capsaicin. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *9*(Suppl 1), 116–120.

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A., & Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1368*(2), 201–215.

Chescoe, D.,& Goodhew, P. J. (1990). *The Operation of Transmission and Scanning Electron Microscopes*. Oxford University Press.

Chowdary, P., Padmakumar, A., & Rengan, A. K. (2023). Exploring the potential of transethosomes in therapeutic delivery: A comprehensive review. *MedComm – Biomaterials and Applications*, *2*(4), Article e59.

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, *10*(2), 57.

Eaknai, W., Bunwatcharaphansakun, P., Phungbun, C., Jantimaporn, A., Chaisri, S., Boonrungsiman, S., Nimmannit, U., & Khongkow, M. (2022). Ethanolic fenugreek extract: Its molecular mechanisms against skin aging and the enhanced functions by nanoencapsulation. *Pharmaceuticals, 15*(2), 254.

Hassan, A. S., Hofni, A., Abourehab, M. A. S., & Abdel-Rahman, I. A. M. (2023). Ginger extract-loaded transethosomes for effective transdermal permeation and anti-inflammation in rat model. *International Journal of Nanomedicine*, *18*, 1259–1280.

Kaur, P., Garg, V., Bawa, P., Sharma, R., Singh, S. K., Kumar, B., Gulati, M., Pandey, N. K., Narang, R., Wadhwa, S., Mohanta, S., Jyoti, J., & Som, S. (2018). Formulation, systematic optimization, in vitro, ex vivo, and stability assessment of transethosome based gel of curcumin. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 11*(14), 41–47.

Kumar, P., Singh, S. K., Handa, V., & Kathuria, H. (2018). Oleic Acid Nanovesicles of Minoxidil for Enhanced Follicular Delivery. *Medicines*, *5*(3), 103.

Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., & Mauer, L. J. (2013). Color and chemical stability of tea polyphenol (−)-epigallocatechin-3-gallate in solution and solid states. *Food Research International*, *53*(2), 909–921.

MilliporeSigma. (n.d.). *Amicon® Ultra centrifugal filters: Featured products, selection guide, and operating parameters*. Merck KGaA. Retrieved March 24, 2026

Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2007). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *5*(1), 561–573.

Pires, F., Tzeli, D., Jones, N. C., Hoffmann, S. V., & Raposo, M. (2025). Electronic states of epigallocatechin-3-gallate in water and in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1′-rac-glycerol) (sodium salt) liposomes. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(3), 1084.

Ramadon, D., Wirarti, G., & Anwar, E. (2017). Novel transdermal ethosomal gel containing green tea (*Camellia sinensis* L. kuntze) leaves extract: formulation and *in vitro* penetration study. *Journal of Young Pharmacists*, *9*(3), 336-340.

Snitsarev, V., Young, M. N., Miller, R. M. S., & Rotella, D. P. (2013). The spectral properties of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) fluorescence in different solvents: Dependence on solvent polarity. *PLOS ONE*, *8*(11), Article e79834.

Soni, G., Kale, K., Shetty, S., Gupta, M. K., & Yadav, K. S. (2020). Quality by design (QbD) approach in processing polymeric nanoparticles loading anticancer drugs by high pressure homogenizer. *Heliyon*, *6*(4), e03846.

Subongkot, T., Ngawhirunpat, T., & Opanasopit, P. (2021). Development of ultradeformable liposomes with fatty acids for enhanced dermal rosmarinic acid delivery. *Pharmaceutics*, *13*(3), 404.

Theppakorn, T. (2013). Green Tea Catechins and Storage Stability. *KKU Science Journal*, 41, 46-55.

Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., & Eliaz, M. (2000). Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *65*(3), 403–418.

Xu, Y.-Q., Yu, P., & Zhou, W. (2019). Combined effect of pH and temperature on the stability and antioxidant capacity of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system. *Journal of Food Engineering*, *250*, 46–54.

Zuo, Y., Chen, H., & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57(2), 307–316.