

การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัดชาเขียว (*Camellia sinensis*)

อัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ¹, รัตนา อินทรานุปกรณ์^{2*}

Received: 16 October 2015

Accepted: 22 December 2015

บทคัดย่อ

บทนำ: สารสกัดชาเขียว (*Camellia sinensis*) อุดมไปด้วยโพลีฟีนอลิกคาเทชินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามการเก็บชาเขียวมีผลต่อความคงตัวของคาเทชิน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดชาเขียว **วิธีดำเนินการวิจัย:** เตรียมตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวจากการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม โดยศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวผสม (Span80: Cremophor RH40, Span80: Kolliphor EL และ Span80: Kolliphor HS15 ที่อัตราส่วน 1:1) สารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropanol, IPA) วัฏภาคน้ำมัน (น้ำมันโจโจบา) และน้ำต่อขอบเขตวัฏภาคระบบไมโครอิมัลชันที่เลือกจะประเมินในหัวข้อดังต่อไปนี้ ความใส ขนาดหยดอนุภาค ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด นอกจากนี้ได้ศึกษาความคงตัวเพื่อหาระบบที่เหมาะสมที่สุดด้วยเช่นกัน **ผลการวิจัย:** สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วยสารสกัดชาเขียว 0.5%, สารลดแรงตึงผิวผสม (Span: Cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1) 49.90%, น้ำมันโจโจบา 24.31% และน้ำ: IPA (1:1) 25.29% มีลักษณะใส และมีความคงตัว ความหนืดต่ำ ค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงของไมโครอิมัลชันภาพหยดอนุภาคของไมโครอิมัลชันจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) พบว่ามีลักษณะทรงกลมนอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC) หลังเก็บทดสอบความคงตัวมีสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือมากกว่าตำรับเจล **สรุปผลการวิจัย:** สูตรไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดจากชาเขียวมีปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับสูงกว่าตำรับเจลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังจากทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 3 เดือน และที่สลับอุณหภูมิร้อนเย็นจำนวน 6 รอบ แสดงว่าตำรับไมโครอิมัลชันสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญได้ดีกว่าตำรับเจลทั่วไปได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: ชาเขียว ไมโครอิมัลชัน แผนภาพไตรภาคเทียม การทดสอบความคงตัว
วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2558; 11(4): 40-56

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

² รองศาสตราจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** รัตนา อินทรานุปกรณ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ 10540

Email : nong2indra@gmail.com

Microemulsion Development for Enhancing the Stability of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract

Aujsharaporn Singhan¹, Ratana Indranupakorn^{2*}

Abstract

Introduction: Green tea extract (*Camellia sinensis*) is a rich source of polyphenolic catechins, which are bioactive compounds. However, the storage of green tea reportedly affects the stability of the catechins. The aim of this research is to develop the microemulsion formulation for enhancing the stability of the active constituents in green tea extract. **Methods:** Using a single isotropic region produced in a pseudoternary phase diagram, the effects of the surfactant mixtures (Span80: Cremophor RH40; Span80: Kolliphor EL and Span80: Kolliphor HS15 [1:1]), and the behavior of the cosurfactant (isopropanol, IPA), oil phase (jojoba oil) and water were evaluated. The selected microemulsion systems were investigated for clarity, droplet size, polydispersity index (PI), conductivity, pH level and viscosity. Stability tests were also performed on the microemulsions to further optimize the selected system. **Results:** The mixtures of water in oil microemulsion containing 0.5% green tea extract, 49.90% surfactant mixtures consisting of Span80 and Cremophor RH40 at the ratio of 1:1, 24.31% jojoba oil, 25.29% water to IPA ratio 1:1, remained stable during storage and exhibited low viscosity, acceptable pH and conductivity levels and droplets size was within the microemulsion range. A transmission electron microscope (TEM) was used to image the microemulsion droplets and revealed the spherical feature of the particles. Furthermore, the percentages of the remaining active constituents in the optimized microemulsions, including caffeine, epicatechin and epigallocatechin gallate were analysed after the stability test using the HPLC method and compared to the prepared green tea extract gel. **Conclusion:** It was found that the optimized microemulsions contained the contents of caffeine, epicatechin and epigallocatechin gallate at levels significantly higher ($p < 0.05$) than the prepared green tea extract gel after storage at room temperature for up to 3 months and through 6 heating and cooling cycles. It could be concluded that the developed microemulsion system significantly ($p < 0.05$) enhances the stability of green tea extract.

Keywords: Green tea, Microemulsion, Pseudoternary phase diagram, Stability test

IJPS 2015; 11(4): 40-56

¹ Cosmetic Sciences Department, Faculty of Pharmacy, Huachiew Chalermprakiet University. Samut Prakan Province.

² Assoc. Prof. Dr., Faculty of Pharmacy, Huachiew Chalermprakiet University. Samut Prakan Province.

* **Corresponding author:** Ratana Indranupakorn, Faculty of Pharmacy, Huachiew Chalermprakiet University. Huachiew Chalermprakiet University. Samut Prakan Province 10540 Thailand, Email : nong2indra@gmail.com

บทนำ

ปัจจุบันชาเขียว และผลิตภัณฑ์จากชาเขียว กำลังได้รับความนิยมทั่วโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากชาเขียวเป็นชาที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการหมัก ทำให้ชาเขียวมีสารโพลีฟีนอลกลุ่มคาเทชิน (catechins) ได้แก่ epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin และ epigallocatechin gallate ในปริมาณสูงกว่าชาชนิดอื่น และในระดับใกล้เคียงกับยอดใบชาสด (Rashidinejad et al., 2014) อีกทั้งชาเขียวยังอุดมไปด้วยสารคาเฟอีน (caffeine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของชาเขียวได้ดี (Komes et al., 2010; Sang, et al., 2011) จึงมีการนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อชะลอการแก่ของเซลล์ ป้องกันการเกิดริ้วรอยก่อนวัย (Cabrera et al., 2006) ป้องกันความชราภาพเนื่องจากแสงแดด (photoaging) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียและเชื้อรา (antibacteria and antifungi activity) และป้องกันการอักเสบ (anti-inflammatory effect) (Gadkari and Balaraman, 2015) แต่ในระหว่างการเก็บรักษาชาเขียว หรือผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของชาเขียว ปริมาณคาเทชินมีแนวโน้มลดลง เนื่องจาก คาเทชินจะมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (Thepkorn, 2013) ดังนั้นเพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดชาเขียว จึงเลือกใช้รูปแบบไมโครอิมัลชัน ที่มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic stability) (Chansiri, 2006) และกลไกการกักเก็บสารสำคัญให้อยู่ในภูมิภาคภายในที่มีขนาดเล็กระดับนาโน ซึ่งเป็นการป้องกันการสัมผัสกับสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญจากภายนอกโดยตรง อีกทั้งไมโครอิมัลชันเพิ่มประสิทธิภาพของการแทรกซึมของสารผ่านผิวหนังอย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าระบบสารละลาย และสูตรยาเตรียมแบบดั้งเดิมทั่วไป (Junyaprasert, 2009)

ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) เป็นการผสมสาร 2 ชนิดที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันให้สามารถ

ละลายอยู่ด้วยกันได้โดยใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นสารก่ออิมัลชัน ทำให้เกิดอนุภาคแขวนลอยที่มีขนาดเล็กมาก (10-140 นาโนเมตร) จึงมองเห็นเป็นอิมัลชันใสเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าเป็นรูปแบบบดาร์บที่ช่วยเพิ่มการละลายของตัวยา หรือสารสำคัญ สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของสารสำคัญ และเตรียมได้ง่ายไม่ซับซ้อน ไม่ต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง เพียงหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย ภูมิภาคน้ำ ภูมิภาคน้ำมัน ภูมิภาคของสารลดแรงตึงผิว (อาจมีสารลดแรงตึงผิวร่วม) โดยหาบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชัน (microemulsion region) ได้จากการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagram) จากส่วนประกอบที่กล่าวมาข้างต้น (Chansiri, 2006; Kantarci et al., 2007)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากชาเขียว ในรูปแบบอื่น และทดสอบความคงตัว เช่น การศึกษาผลของตำรับไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดชาเขียวเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และเชื้อ *Escherichia Coli* ในช่องคลอด โดยทดสอบด้วยเทคนิค disc diffusion พบว่า ตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดชาเขียวมีความคงตัวดีหลังทดสอบด้วย heating/cooling cycle, centrifuge และ freeze thaw cycle เป็นเวลา 3 เดือน โดยตำรับที่มีอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิว Cremophor EL: Glycerol (6:1) มีขนาดอนุภาคและค่าการกระจายอนุภาคน้อยที่สุดเท่ากับ 29.16 นาโนเมตรและ 0.128 ตามลำดับและยังสามารถยับยั้งเชื้อ 2 ชนิดนี้ได้ดีกว่าสารสกัดชาเขียวที่สกัดด้วยน้ำธรรมดา (Gupta et al., 2012) Fang et al. (2006) ได้เตรียมสารสกัดชาเขียวในรูปแบบ liposomes ทำให้ คาเทชินมีความคงตัวดีเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 35 วัน Manea et al. (2014) ศึกษาการกักเก็บสารสกัดชาเขียวใน solid lipid nanoparticles (SLNs) พบว่า SLNs ที่เตรียมได้

มีความคงตัวดี โดยความคงตัวของสารสกัดชาเขียวที่กักเก็บใน SLNs ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิว หากใช้ Tween20 จะทำให้มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มตามปริมาณสารสกัดชาเขียวที่มากขึ้น อีกทั้งเมื่อกักเก็บสารสกัดชาเขียวใน SLNs ทำให้ค่า electrokinetic potential ลดลง ซึ่งค่านี้แสดงผลความคงตัวที่ดีของนาโนพาร์ทิเคิล นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสกัดชาเขียวเพื่อให้ได้สารกลุ่ม major catechins เพิ่มขึ้น โดยการเติมเอนไซม์ tannase ลงในชาเขียว ซึ่งพบว่าตำรับเจลที่กักเก็บสารสกัดชาเขียวที่มีเอนไซม์ tannase 5% นี้มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase, elastase, tyrosinase และมีความคงตัวดีแม้อุณหภูมิ หรือความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงไป เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และที่ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$) เป็นเวลา 4 เดือน มีปริมาณสาร total phenolics และ flavonoids คงอยู่มากกว่าตำรับเจลที่กักเก็บสารสกัดชาเขียวที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ tannase (Hong et al., 2014)

งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ Jojoba oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน เนื่องจากสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดี ใส และคงตัวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Garti et al., 2004) และใช้ Span80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) และมีค่า Hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ต่ำ ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่มีค่า HLB สูง ได้แก่ Cremophor RH40, Kolliphor EL และ Kolliphor HS15 เพื่อให้ได้ค่า HLB ในช่วงของการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำ ในน้ำมันสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุนี้จะไม่เกิดประจุแม้ความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเป็นกรด หรือกลาง ซึ่งเข้าได้ดีกับสภาพความเป็นกรด-ด่างของผิวหนัง จึงไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Junyaprasert, 2009) และในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ isopropyl alcohol (IPA) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมและใช้น้ำปราศจากไอออน (DI water) เป็นวัฏภาคน้ำ จากนั้นประเมินคุณลักษณะ

ทางกายภาพ และทางเคมี รวมถึงทดสอบความคงตัวของไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวเปรียบเทียบกับตำรับอื่น ซึ่งในการศึกษานี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว เนื่องจากเป็นตำรับที่พบบ่อย และมีความคงตัวโดยการเกิดเจลนั้นเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ และระหว่างพอลิเมอร์กับตัวกลาง ทำให้ระยะห่างระหว่างโมเลกุลลดลง โดยเกิดการพัวพัน (crosslink) และมีการเชื่อมข้ามของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อเกิดการเชื่อมข้ามมากขึ้นสายโซ่พอลิเมอร์เหล่านั้นจะถูกตรึงไว้พร้อมกับการเคลื่อนที่ของสารละลายลดลง สารสำคัญที่ละลายอยู่ในวัฏภาคน้ำไม่เกิดการเคลื่อนที่ จึงลดการสัมผัสของสารสำคัญกับสิ่งกระตุ้นโดยตรงจากภายนอกได้ (Khamtawee and Ruangratwan-itahaya, 2011) นอกจากนี้ส่วนประกอบของตำรับเจลไม่มีวัฏภาคน้ำมัน จึงสามารถสกัดเอาสารสำคัญที่ละลายอยู่ในวัฏภาคน้ำออกมาได้ดี

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุ และสารเคมี

Span80 และ Cremophor RH40 (หน้าเขียน ประเทศไทย), Kolliphor EL และ Kolliphor HS15 (BASF ประเทศเยอรมัน), Jojoba oil (ฮงฮวด ประเทศไทย), Methanol, Acetonitrile, Ethyl acetate, Glacial acetic acid และ Absolute ethanol (Merck ประเทศเยอรมัน), Isopropyl alcohol (ORec™ ประเทศนิวซีแลนด์)

เครื่องมือ

เครื่องวัดความหนืด (Brookfield Model DV-II+ Pro viscometer with small sample adapter spindle S18 ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott Instrument Lab 850 ประเทศสิงคโปร์), เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Mettler Toledo™ ประเทศสวิตเซอร์แลนด์), เครื่องวัดขนาด

อนุภาค (Delsa™ Nano C ประเทศญี่ปุ่น), เครื่องแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Thermo Electron Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา), กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Techai™ 20 Twin ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่องทำระเหยแบบสูญญากาศ (LABOROTA 4011 ประเทศเยอรมัน), เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Christ Alpha 1-2 LD ประเทศสหราชอาณาจักร)

การเตรียมสารสกัดชาเขียว

สกัดชาเขียว 100 กรัมด้วย 40% เอทานอล 1000 มล. เป็นเวลา 30 นาที กรองกากทิ้งไป ระเหยเอทานอลออกจากสารสกัดโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นจึงทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 48 ชม. เก็บผงสารสกัดชาเขียวเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐาน และไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว โดยการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม

เตรียมตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐาน (micro-emulsion base) โดยใช้วัฏภาคสารลดแรงตึงผิวผสมที่แตกต่างกัน ได้แก่ Span80 ผสมกับ Cremophor RH40, Kolliphor EL หรือ Kolliphor HS15 ที่

อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นเตรียมอัตราส่วนระหว่างวัฏภาคน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวผสมดังต่อไปนี้ 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยน้ำหนัก แล้วจึงทำการไทเทรตด้วยวัฏภาคน้ำจนถึงจุดที่ของเหลวเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น เปรียบเทียบพื้นที่บริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบจากสารลดแรงตึงผิวผสมที่ศึกษา ผลการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวผสม Span80: Cremophor RH40 ให้ขอบเขตไมโครอิมัลชันมากที่สุด จึงเลือกมาศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของ Span80: Cremophor RH40 โดยปรับอัตราส่วนจาก 1:1 เป็น 2:1 ร่วมกับการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วม IPA คัดเลือกจุดที่เหมาะสมภายในพื้นที่ของระบบวัฏภาคเดียวในแผนภาพไตรภาคเทียมเป็นตัวแทนของตำรับ เพื่อประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัว พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐานทั้งก่อน และหลังเก็บทดสอบความคงตัว ทุกตำรับมีขนาด การกระจายอนุภาค การนำไฟฟ้า ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืดที่เหมาะสม และมีความคงตัวดี จึงเลือกตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐานที่มีความคงตัวดีเพียง 6 ตำรับเพื่อมาผสมสารสกัดชาเขียว (green tea loaded microemulsion; GLM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของตำรับไมโครอิมัลชันที่คัดเลือกมาผสมสารสกัดชาเขียว

Formulations	Compositions (%w/w)			
	Jjoba oil	Span80 : Cremophor RH40 (1:1)	Water:IPA (1:1)	Green tea extract
GLM 1	43.34	45.53	10.63	0.5
GLM 2	33.99	49.90	15.61	0.5
GLM 3	29.36	49.90	20.24	0.5
GLM 4	24.31	49.90	25.29	0.5
GLM 5	29.05	54.76	15.69	0.5
GLM 6	23.98	54.76	20.76	0.5

การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว

นำตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว ทั้ง 6 ตำรับมาประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีดังนี้

ลักษณะภายนอก: ประเมินเสถียรภาพทางกายภาพของตำรับไมโครอิมัลชัน โดยสังเกตด้วยตาเปล่า (visual observation) เช่น ตรวจสอบสี กลิ่น ความใส หรือการแยกชั้น

ประเภทของไมโครอิมัลชัน: นำตำรับไมโครอิมัลชันมาหยดด้วยสีที่ละลายน้ำ จับเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันที่หยดด้วยสีที่ละลายน้ำมัน จากนั้นสังเกตการแพร่กระจายของสีในตำรับไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้

ขนาดและการกระจายอนุภาค (size and polydispersity index; PI): วัดด้วยเครื่อง Beckman Coulter® รุ่น Delsa™ Nano C ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้เทคนิค photon correlation spectroscopy (PCS) วัดซ้ำ 3 ครั้ง

การนำไฟฟ้า (conductivity): วัดด้วยเครื่อง Mettler teledo™ conductivity อุณหภูมิ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

ความเป็นกรด-ด่าง(pH): วัดด้วยเครื่อง (Schott Instrument Lab 850) ที่อุณหภูมิ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

ความหนืด (viscosity): วัดด้วยเครื่อง Brookfield DVII++ Pro viscometer ต่อกับ small sample adapter S18 วัดที่อุณหภูมิ 25°C ซ้ำ 3 ครั้ง

การทดสอบความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว

1. เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน โดยทำการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีในหัวข้อต่างๆ ทุก 15 วัน (Zhao et al., 2006)

2. เก็บสลับอุณหภูมิ (heating/cooling cycle) ที่อุณหภูมิต่ำ 4°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 48 ชม. สลับกับอุณหภูมิสูง 45°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 48 ชม. คิดเป็น 1 รอบ เป็นจำนวน 6 รอบ (Shukla and Patel, 2010) แล้วจึงประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมี

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าตำรับ GLM4 มีความคงตัวมากที่สุดจึงใช้ในการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว และนำไปตรวจสอบสัณฐานวิทยา (morphology) และโครงสร้าง โดยย้อมสีตัวอย่างด้วย uranyl acetate (negative strain) แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) รุ่น Tecnai™ 20 Twin ที่ศักย์ไฟฟ้า 120 kV รวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate

การเตรียมตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

เตรียมเจลผสมสารสกัดชาเขียวโดยดัดแปลงส่วนประกอบในสูตรตำรับจากงานวิจัยของ Khamtawe and Ruangratwanitchaya (2011) เพื่อใช้ในการทดลองเปรียบเทียบประเมินความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว

การเปรียบเทียบความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว GLM4 กับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

นำตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมาทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบแล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างและความหนืดของตำรับเปรียบเทียบกัน

การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชัน GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว ทำโดยชั่งตำรับอย่างละ 1 กรัมละลายด้วย absolute ethanol 9 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบ ต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 ไมครอน นำสารละลายที่กรองได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้สภาวะที่อ้างอิงจากงานวิจัยของ Singhan (2015) ดังนี้ วัฏภาคคงที่แบบย้อนกลับด้วยคอลัมน์ชนิด RP-C18 (ความยาว 25 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม.) วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำ: acetonitrile: ethyl acetate: methanol: glacial acetic acid อัตราส่วนคงที่ 89: 6: 3: 1: 1 (โดยปริมาตร) อัตราการไหล 1.20 มล./นาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร คำนวณหาปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate จากกราฟมาตรฐาน (calibration curves) ของสารสำคัญแต่ละชนิดและรายงานผลเป็นมก.ต่อกรัมสารสกัด (mg/g extract)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากข้อมูลผลการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS รุ่น 17.0 โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) ใน

การวิเคราะห์ความแตกต่างของการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันทั้ง 6 ตำรับเปรียบเทียบกัน แล้วจึงเปรียบเทียบระหว่างวันเริ่มต้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ และใช้สถิติ Independent sample t-test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างร้อยละสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว เปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ

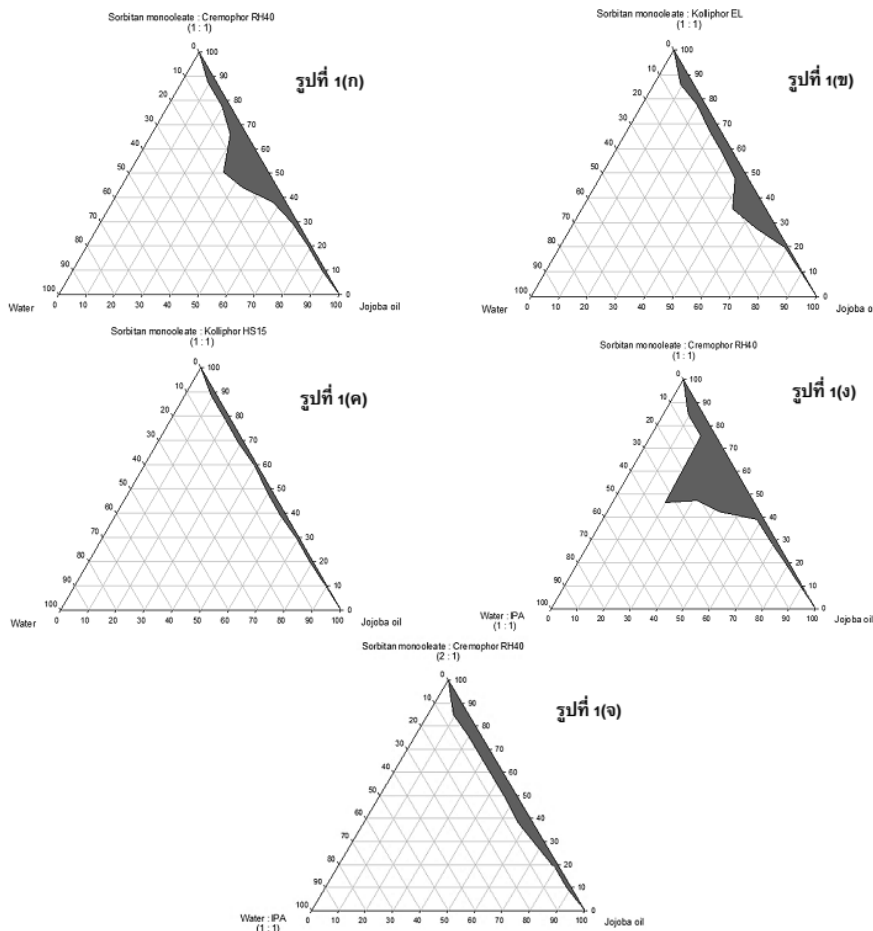
ผลการวิจัย

การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันพื้น และไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว โดยการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียบ

จากการศึกษาลักษณะแผนภาพไตรภาคเทียบ โดยใช้ Jojoba oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน และใช้สารลดแรงตึงผิวผสมที่มีค่า HLB ต่ำผสมกับสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูง เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคน้ำและน้ำมันให้มีความยึดหยุ่นมากขึ้น โดยใช้สารลดแรงตึงผิวผสมที่แตกต่างกันคือ Span80: Cremophor RH40, Span80: Kolliphor EL และ Span80: Kolliphor HS15 อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และมีค่า HLB ของตำรับเท่ากับ 9.15, 8.15 และ 9.15 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ขอบเขตของไมโครอิมัลชันสำหรับระบบที่ประกอบด้วย Jojoba oil, Span80: Cremophor RH40 ที่อัตราส่วน 1:1 และน้ำ เป็นระบบที่มีขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด รูปที่ 1(ก) จึงเลือกใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปโดยเติมสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA พบว่า IPA มีผลต่อขอบเขตของไมโครอิมัลชัน โดยการเพิ่ม IPA เข้าไปในวัฏภาคน้ำด้วยอัตราส่วน 1:1 จะเพิ่มการละลายของส่วนประกอบในตำรับและ ขอบเขตของไมโครอิมัลชันกว้างขึ้น รูปที่ 1(ง) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงาน

วิจัยของ Rukmini et al. (2012) และ Fouad et al. (2013) ที่ว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันหากประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวร่วมจะสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน และยังเพิ่มความยืดหยุ่นของพื้นที่ผิวอีกด้วย และจากการทดลองเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง Span80: Cremophor RH40 จาก 1:1 เป็น 2:1 (HLB = 7.54) พบว่า ขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชันลดลง รูปที่

1(จ) ดังนั้น จึงเลือกใช้ไมโครอิมัลชันที่มีอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสม คือ Span80: Cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA มาประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัว พบว่ามีตำรับไมโครอิมัลชันพื้น 6 สูตรที่มีความคงตัวดี (ตารางที่ 1) จึงเลือกมาผสมสารสกัดชาเขียว ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก



รูปที่ 1 ผลของสารลดแรงตึงผิวผสมที่แตกต่างกัน ได้แก่ Span80: Cremophor RH 40 รูปที่ 1(ก), Span80: Kolliphor EL รูปที่ 1(ข), Span80: Kolliphor HS15 รูปที่ 1(ค) ที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อขอบเขตไมโครอิมัลชัน ผลของสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA ต่อขอบเขตของไมโครอิมัลชัน เมื่อเพิ่มสาร IPA เข้าในปริมาณน้ำที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก รูปที่ 1(ง) ผลของอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวผสม Span80: Cremophor RH40 อัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนักต่อขอบเขตของไมโครอิมัลชัน รูปที่ 1(จ)

การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว

เมื่อนำตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว ทั้ง 6 ตำรับที่เตรียมใหม่ มาประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมี(ตารางที่ 2) เปรียบเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน (ตารางที่ 3) และที่สภาวะ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ(ตารางที่ 4) ตามลำดับได้ผลการทดลองดังนี้

ลักษณะภายนอก: ทุกตำรับมีความคงตัวดี ไม่แยกชั้น สีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อยจากวันเริ่มต้น แต่กลิ่นและความใสไม่เปลี่ยนแปลง

ประเภทของไมโครอิมัลชัน: ผลการตรวจสอบประเภทของไมโครอิมัลชันโดยการหยดสีละลายน้ำ และสีละลายน้ำมัน พบว่า สีละลายน้ำมันกระจายตัวได้เร็วกว่าสีละลายน้ำ เนื่องจากมีวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน ดังนั้นแสดงว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้เป็นชนิดน้ำในน้ำมัน (Xu et al., 2010)

ขนาดและการกระจายอนุภาค: เมื่อเก็บตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวทั้ง 6 ตำรับที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน (ตารางที่ 3) และที่สภาวะ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ (ตารางที่ 4) จากการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณวัฏภาคน้ำมันในตำรับเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มทำให้ขนาดหยาบวัฏภาคภายในใหญ่ขึ้นด้วย ตำรับ GLM4 มีอัตราส่วนวัฏภาคน้ำมันในระบบน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับตำรับอื่นๆ จึงมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยค่อนข้างเล็กเท่ากับ 26.37 ± 9.47 และ 22.37 ± 2.25 นาโนเมตร (nm) ตามลำดับ โดยเมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 28.33 ± 0.47 นาโนเมตร(ตารางที่ 2) แสดงว่าหลังเก็บทดสอบความคงสภาพขนาดอนุภาคมีความคงตัวดี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยขนาดอนุภาคอยู่ช่วงของไมโครอิมัลชัน (10-140 nm) ซึ่งสัมพันธ์กับค่าการกระจายอนุภาคที่

มีค่าน้อยกว่า 1 ในทุกตำรับ ทั้งก่อน (ตารางที่ 2) และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (ตารางที่ 3 และ 4) แสดงว่าหยดอนุภาคภายในจะไม่เกิดการรวมตัวกันได้เป็นอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น และนำไปสู่ความไม่คงตัวของอิมัลชัน (Patel et al., 2010)

การนำไฟฟ้า: ตำรับ GLM4 มีค่าการนำไฟฟ้ามีค่าสูงกว่าตำรับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากมีอัตราส่วนวัฏภาคน้ำในตำรับมากที่สุด โดยเมื่อเทียบวันที่เตรียมใหม่ที่มีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ $17.21 \pm 0.08 \mu\text{S/cm}$ (ตารางที่ 2) กับหลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ heating/cooling cycle (ตารางที่ 3 และ 4) มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ 16.18 ± 0.01 และ $18.75 \pm 0.07 \mu\text{S/cm}$ ไมโครซีเมนซ์ต่อเซนติเมตร ($\mu\text{S/cm}$) ตามลำดับ พบว่ามีค่าการนำไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ค่าที่ได้พบว่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และยังคงอยู่ในช่วงของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน กล่าวคือโดยทั่วไปอิมัลชันทุกชนิดที่มีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า $50 \mu\text{S/cm}$ จะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งหากค่าการนำไฟฟ้าต่ำกว่านี้จะเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Pinkhien, 2014) ดังนั้นแสดงว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้เป็นชนิดน้ำในน้ำมัน

ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด: ตำรับ GLM4 มีค่าความเป็นกรดต่างเข้ากันได้กับ pH ของผิวหนังโดยหลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง 90 วันมี pH เท่ากับ 7.27 ± 0.15 (ตารางที่ 3) และหลังเก็บที่ heating/cooling จำนวน 6 รอบมี pH เท่ากับ 7.54 ± 0.01 (ตารางที่ 4) โดยแตกต่างจากวันที่เตรียมใหม่ที่มีค่าเท่ากับ 7.64 ± 0.01 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) แสดงว่าระยะเวลาในการเก็บมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับไมโครอิมัลชันเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยและตำรับ GLM4 หลังเก็บทดสอบความคงสภาพที่อุณหภูมิห้อง 90 วันมีความหนืดเฉลี่ยเท่ากับ 179.83 ± 0.29 (ตารางที่ 3) และหลังเก็บที่ heating/cooling จำนวน 6 รอบมีความหนืด

เฉลี่ยเท่ากับ 184.57 ± 5.25 cP (ตารางที่ 4) ซึ่งความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงจากวันเริ่มต้นที่มีค่าเท่ากับ 181.33 ± 2.02 cP อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2) เนื่องจากการมีปริมาณวัฏภาคน้ำในตำรับเพิ่มขึ้น

จึงใช้ปริมาณวัฏภาคน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวที่มีลักษณะค่อนข้างหนืดในปริมาณที่น้อยลง ทำให้ตำรับ GLM4 มีความหนืดน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตำรับอื่นๆ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียววันเริ่มต้น (n=3)

Formulations	Initial day				
	Size (nm±SD)	Polydispersity index	Conductivity (µS/cm ± SD)	pH±SD	Viscosity (cP±SD)
GLM 1	54.63±1.76*a	0.376±0.06*b	0.91±0.00*a	7.38±0.07*a	205.83±2.36*b
GLM 2	38.03±0.95*a	0.343±0.01*b	3.70±0.02*a	7.75±0.00*a	224.50±0.50*a
GLM 3	35.20±3.78*b	0.247±0.03*b	9.41±0.02*a	7.73±0.01*a	200.67±1.61*b
GLM 4	28.33±0.47*b	0.248±0.03*b	17.21±0.08*a	7.64±0.01*b	181.33±2.02*b
GLM 5	41.70±0.90*a	0.428±0.01*b	3.31±0.02*b	7.72±0.01*a	248.73±4.07*a
GLM 6	30.40±3.31*b	0.337±0.02*b	7.89±0.03*a	7.68±0.02*a	237.23±3.33*b

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ (GLM1- GLM6) ภายใในการเก็บ ทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน (initial day) และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (room temperature 90 days และ heating/cooling 6 cycles) ภายใในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน (initial day) และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (room temperature 90days และ heating/cooling 6cycles) ภายใในสูตรตำรับเดียวกัน

ตารางที่ 3 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวเก็บที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน (n=3)

Formulations	Room temperature 90 days				
	Size (nm±SD)	Polydispersity index	Conductivity(µS/cm ± SD)	pH±SD	Viscosity (cP±SD)
GLM 1	27.00±2.12*a	0.402±0.07*b	0.79±0.00*a	7.10±0.01*a	196.17±1.16*a
GLM 2	26.57±0.38*a	0.279±0.10*b	3.59±0.01*a	7.45±0.01*a	233.60±1.39*b
GLM 3	23.67±0.49*a	0.126±0.02*b	10.97±0.16*a	7.39±0.01*a	198.67±1.53*b
GLM 4	26.37±9.47*b	0.120±0.03*b	16.18±0.01*a	7.27±0.15*a	179.83±0.29*b
GLM 5	20.70±1.82*b	0.565±0.05*b	2.84±0.00*a	7.18±0.02*a	239.07±2.02*b
GLM 6	32.03±2.35*b	0.390±0.09*b	7.61±0.04*a	7.37±0.02*a	232.30±1.97*b

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ (GLM1- GLM6) ภายใในการเก็บ ทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน (initial day) และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (room temperature 90 days และ heating/cooling 6 cycles) ภายใในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน (initial day) และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (room temperature 90 days และ heating/cooling 6 cycles) ภายใในสูตรตำรับเดียวกัน

ตารางที่ 4 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว เก็บที่ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ (n=3)

Formulations	Heating/cooling 6 cycles				
	Size (nm±SD)	Polydispersity index	Conductivity (µS/cm ± SD)	pH±SD	Viscosity (cP±SD)
GLM 1	40.07±5.26*a	0.326±0.08*b	0.95±0.01*a	7.64±0.02*a	203.77±1.31*b
GLM 2	32.87±0.64*a	0.288±0.01*b	2.74±0.01*a	7.62±0.01*a	231.10±5.43*b
GLM 3	32.77±0.81*b	0.193±0.13*b	10.12±0.09*a	7.58±0.03*a	198.77±3.07*b
GLM 4	22.37±2.25*b	0.187±0.03*b	18.75±0.07*a	7.54±0.01*b	184.57±5.25*b
GLM 5	25.50±6.25*b	0.484±0.19*b	3.36±0.08*b	7.63±0.02*a	242.77±1.70*b
GLM 6	23.37±1.88*a	0.611±0.04*a	8.42±0.07*a	7.59±0.01*a	249.23±6.83*a

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ (GLM1- GLM6) ภายในการเก็บ ทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน (initial day) และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (room temperature 90 days และ heating/cooling 6 cycles) ภายในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน (initial day) และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (room temperature 90 days และ heating/cooling 6 cycles) ภายในสูตรตำรับเดียวกัน

การเปรียบเทียบความคงตัวทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดจากชาเขียว GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดจากชาเขียว

ผลการทดลองข้างต้น ได้คัดเลือกสูตรตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว GLM4 เนื่องจากเป็นสูตรที่มีอัตราส่วนวิภาคหน้าในตำรับมากที่สุด (ตารางที่ 1) จึงมีความหนืดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอื่นๆ และความหนืดไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) อีกทั้งขนาดอนุภาคและการกระจายอนุภาคไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบก่อน (ตารางที่ 2) และหลังการทดสอบความคงตัว (ตารางที่ 3 และ 4) การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมี ผลทดลองพบว่าลักษณะภายนอกของ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว หลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ มีการเปลี่ยนแปลงของสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย แต่กลิ่นและความใสไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับหลัง

เตรียมใหม่ๆ และไม่เกิดการแยกชั้น

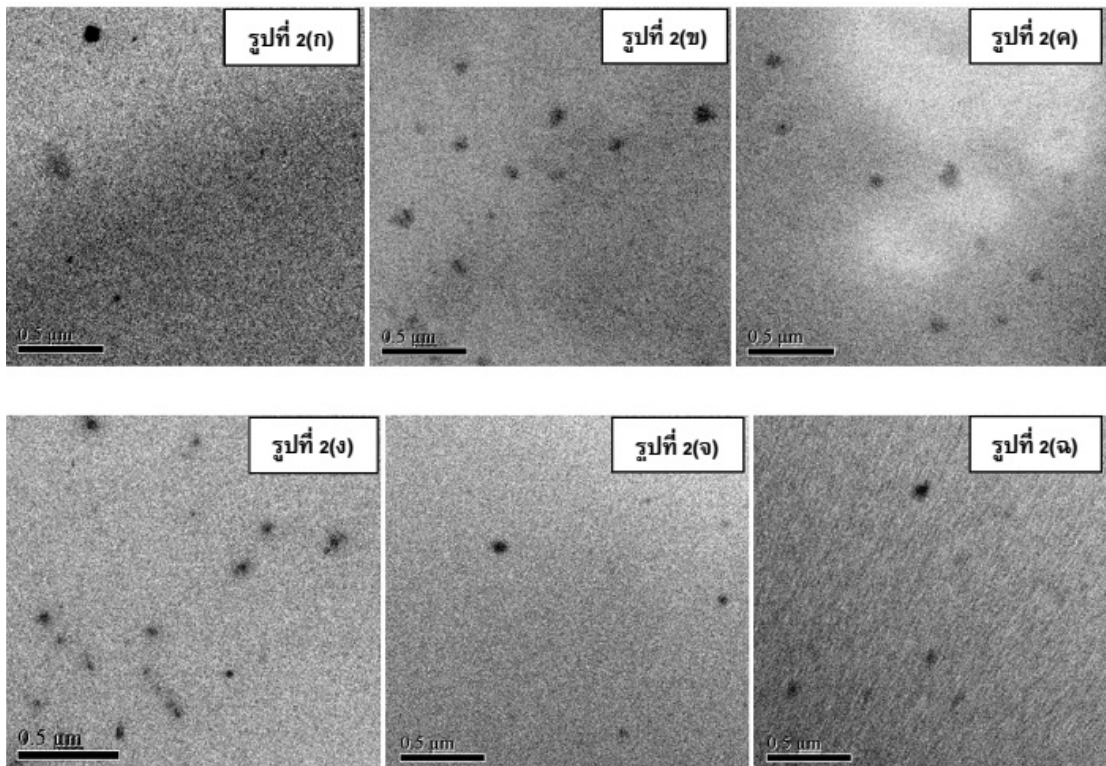
ขณะที่ pH เฉลี่ยของตำรับ GLM4 หลังเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบมีค่า pH เท่ากับ 7.27±0.15 และ 7.54±0.01 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตำรับเจลที่มีค่า pH เท่ากับ 5.82±0.01 และ 5.81±0.01 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แสดงว่าตำรับ GLM4 มีความเป็นกลาง ซึ่งก็ยิ่งถือว่ามีค่าใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ในขณะที่ตำรับเจลมี pH เป็นกรดอ่อนๆ และใกล้เคียงกับตำรับเจลพื้นวันเริ่มต้น หลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ heating/cooling cycles จำนวน 6 รอบ ซึ่งเท่ากับ 5.78±0.01, 5.76±0.02 และ 5.80±0.01 ตามลำดับ เนื่องจากสารก่อเจลที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ Carbopol 940 ที่มีประจุลบ ซึ่งมักใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด และเป็นสารก่อเจลในผลิตภัณฑ์ โดย Carbopol 940 ในน้ำ จะมีค่า pH ประมาณ 3 จึงต้องเติม triethanolamine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเบส เพื่อช่วยปรับให้ carbopol 940 อยู่ในรูปที่แตกตัวเกิดแรงผลักกันระหว่างประจุของ

หมู่ carboxylate ทำให้เจลมีความหนืดที่ดี และ pH อยู่ในช่วง 5.5-7.0 จากการทดลองพบว่า ตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวมีค่า pH ไม่เปลี่ยนแปลง

หลังทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง และ heating/cooling จำนวน 6 รอบ ตำรับไมโครอิมัลชันมีความหนืดเฉลี่ยเท่ากับ 179.83 ± 0.29 และ 184.57 ± 5.25 cP ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าตำรับเจลที่มีความหนืดเท่ากับ 901.80 ± 4.63 และ 1004.23 ± 5.75 cP ตามลำดับ เนื่องจากตำรับเจลเกิด

การจับตัวเป็นก้อนหลังเก็บที่ heating/cooling จำนวน 6 รอบ จึงทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น

การตรวจสอบสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐาน และตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวทั้งก่อน และหลังทดสอบความคงตัว ด้วยการถ่ายภาพผ่าน TEM (รูปที่ 2) พบว่ามีลักษณะเป็นหยดของเหลวทรงกลมขนาดประมาณ 50nm ซึ่งสอดคล้องกับขนาดอนุภาคที่วัดได้จากเครื่องวัดขนาดอนุภาค โดยใช้เทคนิค PCS



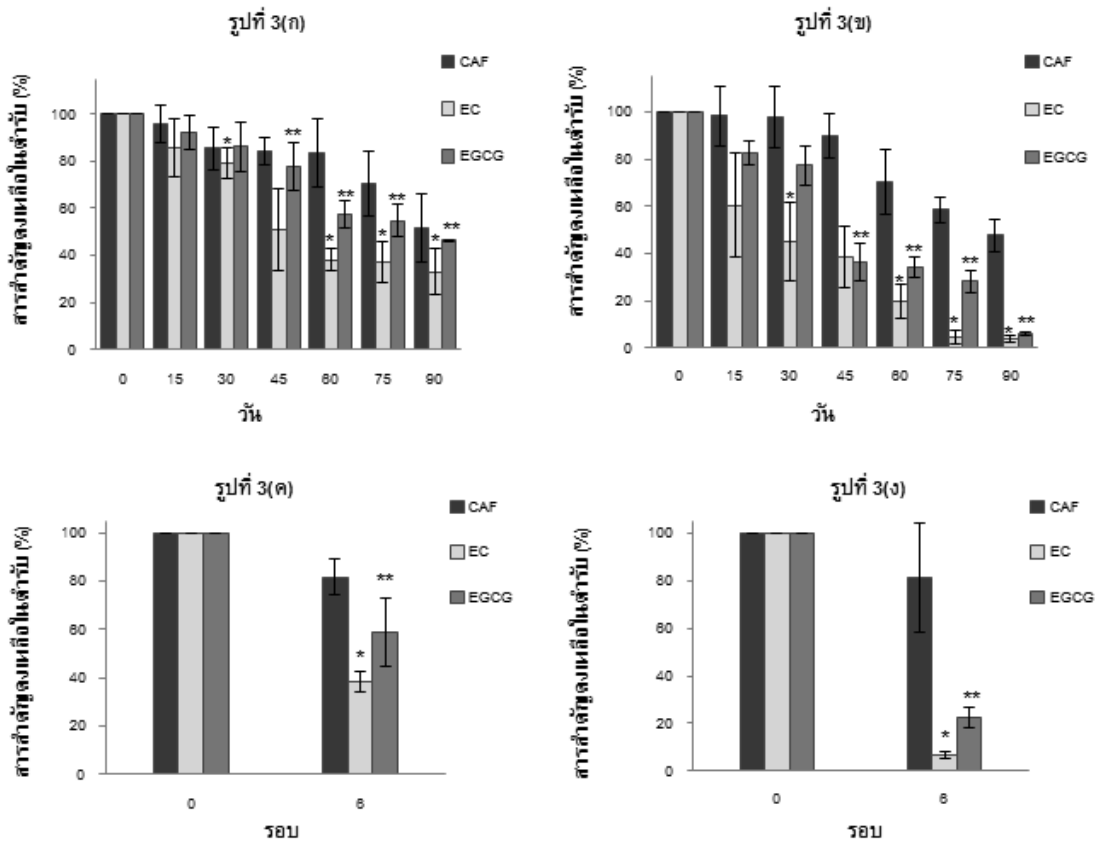
รูปที่ 2 สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐานที่ initial day รูปที่ 2(ก) หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน รูปที่ 2(ข) และหลังเก็บที่ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบรูปที่ 2(ค) สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว (GLM4) ที่ initial day รูปที่ 2(ง) หลังเก็บ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน รูปที่ 2(จ) และหลังheating/cooling cycle จำนวน 6 รอบรูปที่ 2(ฉ)

การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate จากการสร้างกราฟมาตรฐานของ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่มีความเข้มข้น 0.005-0.1, 0.01-0.2 และ 0.015-0.4 mg/mL ตามลำดับ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่อ้างอิงจากงานวิจัยของ Singhan (2015) และทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า retention time ของสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate เป็น 4.026, 8.842 และ 16.684 นาที ตามลำดับ นำค่าพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ากราฟมาตรฐานของ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate เป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ของทุกสารมากกว่า 0.995 อ้างอิงจากงานวิจัยของ Singhan (2015)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดชาเขียวก่อนถูกกักเก็บในตำรับ GLM4 ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามี caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate เท่ากับ 31.71 ± 0.01 , 9.20 ± 0.23 และ 91.45 ± 0.98 มก.ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และจากการหาปริมาณสารสำคัญหลังถูกกักเก็บในตำรับ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว โดยทำการสกัดแยกสารสำคัญที่อยู่ในวัฏภาคน้ำด้วย absolute ethanol แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกองค์ประกอบอื่นๆ ที่อยู่ในตำรับและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าความหนืดของเจลไม่มีผลต่อการสกัดสารสำคัญ รวมทั้งตำรับ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวที่อุณหภูมิห้องมีเปอร์เซ็นต์สาร

caffeine คงเหลือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์สาร epicatechin คงเหลือในทั้ง 2 ตำรับ พบว่าที่ 30, 60, 75 และ 90 วัน ตำรับเจลมีปริมาณสาร epicatechin ลดลงมากกว่าตำรับ GLM4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์สาร epigallocatechin gallate คงเหลือในทั้ง 2 ตำรับ พบว่าที่ 45, 60, 75 และ 90 วัน ตำรับเจลมีเปอร์เซ็นต์สาร epicatechin ลดลงมากกว่า GLM4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งเมื่อครบ 90 วันมีเปอร์เซ็นต์สาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันเท่ากับ 51.88 ± 14.53 , 33.05 ± 9.69 และ $46.45 \pm 0.38\%$ ตามลำดับ รูปที่ 3(ก) ขณะที่ตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมีเปอร์เซ็นต์สาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือเท่ากับ 47.77 ± 6.86 , 3.74 ± 1.42 และ $6.23 \pm 0.78\%$ ตามลำดับ รูปที่ 3(ข) นอกจากนี้ยังพบว่าตำรับ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพโดยวิธีเร่งในสภาวะร้อนสลับเย็น จำนวน 6 รอบ มีเปอร์เซ็นต์สาร caffeine คงเหลือของทั้ง 2 ตำรับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์สาร epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเก็บครบ 6 รอบ ซึ่ง GLM4 มีเปอร์เซ็นต์สาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือเท่ากับ 81.72 ± 7.40 , 38.50 ± 4.34 และ $59.01 \pm 14.29\%$ ตามลำดับ รูปที่ 3(ค) ขณะที่ตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว มีเปอร์เซ็นต์สาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือเท่ากับ 81.16 ± 23.01 , 6.86 ± 1.52 และ $22.54 \pm 4.15\%$ ตามลำดับรูปที่ 3(ง)



รูปที่ 3 เปรอร์เซ็นต์สารสำคัญ caffeine (CAF), epicatechin (EC) และ epigallocatechin gallate (EGCG) คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว รูปที่ 3(ก) และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว รูปที่ 3(ข) หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว รูปที่ 3(ค) และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว รูปที่ 3(ง) หลังเก็บที่ heating-cooling cycle จำนวน 6 รอบ(n=3)

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ epicatechin (EC) คงเหลือระหว่างตำรับไมโครอิมัลชัน และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ epigallocatechin gallate (EGCG) คงเหลือระหว่างตำรับไมโครอิมัลชัน และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

จากผลการทดลองพบว่าสารสำคัญที่ถูกกักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชัน และตำรับเจลมีปริมาณลดลงหลังจากเก็บทดสอบความคงตัว อาจเนื่องจากคาเทชินมีความคงตัวดีในสภาวะที่เป็นกรด ($pH < 4$) แต่จะไม่คงตัวในสภาวะที่เป็นด่าง ($pH > 8$) และถ้าเก็บในสภาวะที่มีความชื้นมากๆ ก็ทำให้เกิดการสลายตัวได้

ง่าย (Thepkorn, 2013) จากผลการศึกษาในครั้งนี้ตำรับไมโครอิมัลชันมีค่า pH เกือบจะเป็นด่าง และทำการทดสอบความคงตัวที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง ดังนั้นจึงทำให้สารคาเทชินที่ถูกกักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันบางส่วนสลายตัวไป แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับ GLM4 และตำรับเจล พบว่าตำรับไมโคร

อีมีลชันสามารถเก็บกัก และมีความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดชาเขียวดีกว่าตำรับเจล โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่มีเปอร์เซ็นต์คงเหลือในตำรับ GLM4 สูงกว่าในตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว แต่เปอร์เซ็นต์ caffeine คงเหลือในตำรับทั้งสองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาส่วนประกอบและอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอีมีลชันชนิดน้ำในน้ำมัน เพื่อใช้ในการกักเก็บสารสำคัญจากชาเขียว โดยสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม ใช้ Jojoba oil เป็นวัสดุภาคน้ำมัน ใช้สารลดแรงตึงผิวผสมแตกต่างกัน คือ Span80: Cremophor RH40, Span80: Kolliphor EL, Span80: Kolliphor HS15 ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักพบว่าสารลดแรงตึงผิวผสมที่มีขอบเขตไมโครอีมีลชันมากที่สุด คือ Span80: Cremophor RH40 จึงเลือกมาศึกษาต่อโดยการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมจากร้อยละ 1:1 เป็น 2:1 โดยน้ำหนัก ร่วมกับการสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA พบว่า IPA ช่วยขยายขอบเขตของไมโครอีมีลชันให้กว้างขึ้นได้ แต่การเพิ่มอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมเป็น 2:1 กลับทำให้ขอบเขตไมโครอีมีลชันลดลง ดังนั้นส่วนประกอบที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครอีมีลชันน้ำในน้ำมันเพื่อใช้กักเก็บสารสำคัญจากชาเขียว คือ Jojoba oil, Span80: Cremophor RH40 (1:1), น้ำ: IPA (1:1) โดยที่ตำรับ GLM4 มีความคงตัวของสารสำคัญ caffeine คงเหลือของทั้งสองตำรับหลังเก็บทดสอบความคงตัวมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์สารสำคัญ epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอีมีลชันคงเหลืออยู่ในตำรับมากกว่าตำรับเจลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังเก็บ

ทดสอบความคงสภาพที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และที่สภาวะ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ อาจเนื่องจากคุณสมบัติคงตัวของอนุภาคของไมโครอีมีลชัน ทำให้สารสำคัญคงตัวได้นานกว่าตำรับเจลแม้อุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษาจะมีการเปลี่ยนแปลง รวมถึงการกักเก็บสารสำคัญอยู่ในหยดวิภาคภายในจึงสามารถป้องกันสารสำคัญไม่ให้ถูกทำลายจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ดีกว่าตำรับเจล

References

- Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial Effects of green tea: A review. *JACN* 2006; 25(2): 79-99.
- Chansiri G. *Pharmaceutical emulsions*. Nakhon Pathom: Silpakorn University; 2006. 147-148.
- Fang JY, Hwang TL, Huang YL, Fang CL. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *Int J Pharm* 2006; 310: 131-138.
- Fouad AS, Basalious BE, EL.Nabarawi AM, Tayel AS. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: in vitro/in vivo evaluation. *Int J Pharm* 2013; 453: 569-578.
- Gadkari VP, Balaraman M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food Bioprod Process* 2015; 93: 122-138.
- Garti N, Shevachman M, Shani A. solubilization of lycopene in jojoba oil microemulsion. *JAOCS* 2004; 81(9): 873-877.
- Gupta S, Sahni JK, Ali J, Gabrani R, Dang S. Development and characterization of

- green tea loaded microemulsion for vaginal infections. *Adv Mater Lett* 2012; 3(6): 493-497.
- Hong YH, Jung EY, Noh DO, Suh HJ. Physiological effects of formulation containing tannase-converted green tea extract on skin care: physical stability, collagenase, elastase and tyrosinase activities. *IMR* 2014; 3: 25-33.
- Junyaprasert V. Nanotechnology: Skin delivery of drugs and cosmetics. Bangkok: Prachachon; 2009. 129-166.
- Kantarci G, Ozguney I, Karasulu Y, Arzik S, Guneri T. Comparison of different water/oil microemulsions containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate and skin irritation studies. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8(4):E1-E7.
- Khamtawee C, Ruangratwanitchaya C. Development of lychee seed extract gel [Senior project]. Samutprakarn. Huachiew Chalermprakiet University; 2011. page 46.
- Komes D, Horzic D, Belscak A, Ganic KK, Vulic I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Res Int* 2010; 43: 167-176.
- Manea AM, Andronescu C, Meghea A. Green tea extract loaded into solid lipid nanoparticles. *UPB Sci Bull* 2014; 76(2): 125-136.
- Patel V, Kukadiya H, Mashru R, Surti N, Mandal S. Development of microemulsion for solubility enhancement of clopidogrel. *Iran J Pharm Res* 2010; 9(4): 327-334.
- Pinkhien T. The development of nanoemulsions containing grape seed extracts from *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) and their bioefficacy study [Thesis]. Samutprakarn. Huachiew Chalermprakiet University; 2014.
- Rashidinejad A, Birch E. J, Sun-Waterhouse D, Everett W. D. Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chem* 2014; 156: 176-183.
- Rukmini A, Raharjo S, Hastuti P, Supriyadi S. Formulation and stability of water-in-virgin coconut oil microemulsion using ternary food grade nonionic surfactants. *Int Food Res J* 2012; 19(1): 259-264.
- Sang S, Lambert DJ, Ho TC, Yang SC. The Chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol Res* 2011; 64: 87-99.
- Shukla BJ, Patel JS. Formulation and evaluation of self micro emulsifying system of candesartan cilexetil. *Int J Pharm Pharm Sci* 2010; 2(4): 143-146.
- Singhan A. Development of microemulsion for enhancing the stability of green tea (*Camellia sinensis*) extract [Thesis]. Samutprakarn. Huachiew Chalermprakiet University; 2015.
- Thepkorn T. Green tea catechins and storage stability. *KKU Sci J* 2013; 41(1): 46-55.
- Xu J, Fan JQ, Yin QZ, et al. The preparation of neem oil microemulsion (*Azadirachta indica*) and the comparison of acaricidal time between neem oil microemulsion and others formulations in vitro. *Vet Parasitol* 2010; 169: 399-403.

Zhao X, Liu PJ, Zhang X, Li Y. Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. *Int J Pharm* 2006; 327: 58-64.