



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การศึกษาการปลดปล่อยและตรวจสอบความคงตัวของไนอาซิनाไมด์
และคาเฟอีนจากตำรับทาผิวหนังชนิดต่าง ๆ

IN VITRO RELEASES STUDY AND STABILITY INVESTIGATION
OF NIACINAMIDE AND CAFFEINE FROM DIFFERENT
TOPICAL FORMULATIONS

จริยาพร พุ่มสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีเภสัชกรรม)
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

พ.ศ. 2558

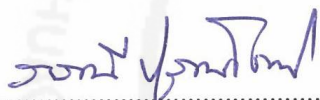
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การศึกษาการปลดปล่อยและตรวจสอบความคงตัวของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน
จากตำรับทาผิวชนิดต่าง ๆ

IN VITRO RELEASES STUDY AND STABILITY INVESTIGATION OF NIACINAMIDE AND
CAFFEINE FROM DIFFERENT TOPICAL FORMULATIONS

จริยาพร พุ่มสกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ตรวจสอบและอนุมัติให้
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีเภสัชกรรม)
เมื่อวันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2558



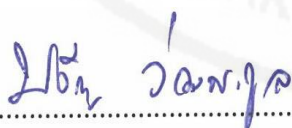
อาจารย์ ดร.กรณิ ปุรณโชติ
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ



อาจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์
อาจารย์ที่ปรึกษา



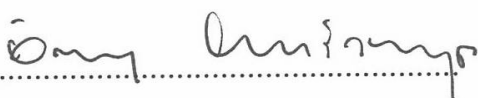
อาจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์
กรรมการ




อาจารย์ ดร.ปิวิณา ว่องตระกูล
กรรมการ



อาจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์
ประธานหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีเภสัชกรรม)



รองศาสตราจารย์อียสา จันทร์วิทยานุชิต
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย



รองศาสตราจารย์ ดร.จันทรา ชัยพานิช
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การศึกษาการปลดปล่อยและตรวจสอบความคงตัวของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน
จากตำรับทาผิวชนิดต่าง ๆ

จริยาพร พุ่มสกุล 536005

เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีเภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สุนี ชาญณรงค์, Ph.D.

บทคัดย่อ

การปลดปล่อยและความคงตัวของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับทาผิว 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ เจล วานิชขิงครีม ไฮโดรฟลิคอิมัลชันและโคลด์ครีม ได้ถูกตรวจสอบ การศึกษาการปลดปล่อยของสารสำคัญทำโดยใช้ Franz-type diffusion cells เจลเป็นตำรับชนิดน้ำและมีความหนืดน้อยที่สุด ทั้งวานิชขิงครีมและไฮโดรฟลิคอิมัลชันเป็นครีมชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งมีความแตกต่างกันในส่วนของการอิมัลชันและชนิดของน้ำมันที่ใช้ วานิชขิงครีมมีลักษณะที่เหลวกว่าไฮโดรฟลิคอิมัลชัน ส่วนโคลด์ครีมเป็นครีมชนิดน้ำในน้ำมันและมีความหนืดมากที่สุด การศึกษาการปลดปล่อยในหลอดทดลองของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากทั้ง 4 ตำรับ ให้ผลทางจลนศาสตร์การปลดปล่อยคล้ายที่คลึงกัน จลนศาสตร์การปลดปล่อยของตำรับส่วนใหญ่เป็นไปตามสมการของ Higuchi สารทั้งสองชนิดสามารถปลดปล่อยได้มากและอัตราเร็วสูงที่สุดจากตำรับเจล และปลดปล่อยได้น้อยที่สุดจากตำรับโคลด์ครีม จากผลการศึกษาแสดงว่าความหนืดและชนิดของครีมพื้นมีผลอย่างมากต่อการปลดปล่อยสารสำคัญ ความคงตัวของตำรับเมื่อเก็บไว้นาน 6 เดือน พบว่าค่าพีเอชของทุกตำรับมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องเฉพาะตำรับไฮโดรฟลิคอิมัลชันเกิดการเปลี่ยนสี เมื่อเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าตำรับโคลด์ครีมเกิดการแยกชั้นและตำรับเจลเกิดการหดตัว ความคงตัวทางเคมีของทั้งโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนมีความคงตัวตัวอย่างชัดเจนในตำรับต่างๆ อายุตำรับที่นานที่สุดสำหรับโนอาซิनाไมด์พบในตำรับวานิชขิงครีม ส่วนคาเฟอีนมีอายุตำรับที่นานที่สุดในตำรับเจล โดยมีอายุประมาณ 12 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

คำสำคัญ: โโนอาซิनाไมด์ คาเฟอีน สารลดริ้วรอย สารลดผิวคล้ำ

**IN VITRO RELEASE STUDY AND STABILITY INVESTIGATION OF NIACINAMIDE AND
CAFFEINE FROM DIFFERENT TOPICAL FORMULATIONS**

JARIYAPORN PUMSAKUL 536005

MASTER OF PHARMACY (PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: SUNEE CHANNARONG, Ph.D.

ABSTRACT

The release and the stability of niacinamide and caffeine from four different formulations which were gel, vanishing cream, hydrophilic emulsion and cold cream were studied. The release of active components was evaluated using Franz-type diffusion cells. Gel is an aqueous phase which possesses the lowest viscosity. Both vanishing cream and hydrophilic emulsion are the same in o/w types with difference in emulsifying agents and oil components. The vanishing cream is more liquid than hydrophilic emulsion whereas the cold cream which is w/o type and the most inflexible. *In vitro* releases of niacinamide and caffeine from four different formulations showed the similar kinetics. Both niacinamide and caffeine showed the highest release amounts and the fastest rates from the gel. The lowest release amount and release rate were found in cold cream. The results suggest that the viscosity and type of cream bases strongly affect the release of the actives from the formulations. The physical stability of formulations after storage for 6 months, was found that the pH values of all formulations were found to increase. At room temperature, only the hydrophilic emulsion preparation was changed in color. At 45°C/75%RH, only the cold cream preparation was found to crack, the gel underwent syneresis. The chemical stability of niacinamide and caffeine from creams and gel were found remarkably to degrade. The longest shelf life of niacinamide was found in vanishing cream and that of caffeine was found in gel preparation. The shelf life of niacinamide and caffeine at 4°C were about 12 months and 6 months, respectively.

Keywords: Niacinamide, caffeine, antiwrinkle, whitening

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ ดร.สุณี ชาญณรงค์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเภสัชกรรมที่ได้ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการเบิกจ่ายอุปกรณ์และสารเคมี

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้การอบรมสั่งสอน และให้โอกาสการเรียนรู้ แก่ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีเภสัชกรรม ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและคอยให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือทำการวิจัย

ผู้วิจัยหวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้อ่านได้เป็นอย่างดี

จริยาพร พุ่มสกุล

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญแผนภูมิ | ช |
| สารบัญภาพ | ฌ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 3 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | |
| 2.1 เมลานิน | 4 |
| 2.2 การรักษา Hyperpigmentation | 7 |
| 2.3 รอยเหี่ยวย่น | 11 |
| 2.4 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย | 14 |
| บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย | |
| 3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี | 16 |
| 3.2 วิธีการศึกษาวิจัย | 17 |
| บทที่ 4 ผลงานวิจัย | |
| 4.1 การประเมินคุณภาพของตำรับ | 26 |
| 4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง | 27 |
| 4.3 การศึกษาการปลดปล่อยของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับ | 48 |
| 4.4 การศึกษาความคงตัวของตำรับ | 55 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ | |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย | 70 |
| 5.2 อภิปรายผล | 71 |
| 5.3 ข้อเสนอแนะ | 74 |
| เอกสารอ้างอิง | 75 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐาน | 80 |
| ภาคผนวก ข ข้อมูลการแพร่ผ่านของไนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนผ่านเมมเบรน โดยใช้ Franz-type diffusion cells | 82 |
| ประวัติผู้เขียน | 90 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | ส่วนประกอบที่ใช้ในสูตรตำรับ | 19 |
| 2 | ลักษณะปรากฏทางกายภาพของตำรับเมื่อเตรียมเสร็จ | 26 |
| 3 | ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของโนอาซิनाไมด์ | 29 |
| 4 | ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของคาเฟอีน | 30 |
| 5 | ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของโนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิชิงครีม | 33 |
| 6 | ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานคาเฟอีนในตำรับวานิชิงครีม | 34 |
| 7 | ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานโนอาซิनाไมด์ในตำรับเจล | 35 |
| 8 | ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานคาเฟอีนในตำรับเจล | 36 |
| 9 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์โนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิชิงครีม | 38 |
| 10 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์โนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิชิงครีม | 38 |
| 11 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับวานิชิงครีม | 39 |
| 12 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับวานิชิงครีม | 39 |
| 13 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์โนอาซิनाไมด์ในตำรับเจล | 40 |
| 14 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์โนอาซิनाไมด์ในตำรับเจล | 40 |
| 15 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับเจล | 41 |
| 16 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับเจล | 41 |
| 17 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของโนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิชิงครีมที่ flow rate ของ mobile phase ที่ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด | 43 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 18 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของคาเฟอีนในตำรับวานิลลาซึ่งครีม ที่ flow rate ของ mobile phase ที่ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด | 44 |
| 19 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของโนอาซิโนไมด์ในตำรับเจล ที่ flow rate ของ mobile phase ที่ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด | 45 |
| 20 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของคาเฟอีนในตำรับเจล ที่ flow rate ของ mobile phase ที่ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด | 46 |
| 21 ค่า k และ R ² ของโนอาซิโนไมด์จากตำรับต่าง ๆ | 54 |
| 22 ค่า k และ R ² ของคาเฟอีนจากตำรับต่าง ๆ | 54 |
| 23 ค่า fluxes ใน 24 ชั่วโมง ของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนจากตำรับชนิดต่าง ๆ | 55 |
| 24 ผลความคงตัวทางกายภาพของตำรับที่เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) ที่เวลาต่าง ๆ | 56 |
| 25 ผลความคงตัวทางกายภาพของตำรับที่เก็บในอุณหภูมิห้อง ที่เวลาต่าง ๆ | 57 |
| 26 ผลความคงตัวทางกายภาพของตำรับที่เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) ที่เวลาต่าง ๆ | 58 |
| 27 ผลความคงตัวทางเคมีของตำรับที่เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) | 60 |
| 28 ผลความคงตัวทางเคมีของตำรับที่เก็บในอุณหภูมิห้อง | 61 |
| 29 ผลความคงตัวทางเคมีของตำรับที่เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) | 62 |
| 30 ค่าคงที่การสลายตัว (ค่า slope) ของโนอาซิโนไมด์ และ T _{90%} (อายุตำรับ) ที่เก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ | 64 |
| 31 ค่าคงที่การสลายตัว (ค่า slope) ของคาเฟอีน และ T _{90%} (อายุตำรับ) ที่เก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ | 66 |
| 32 ความคงตัวทางกายภาพเมื่อเก็บตำรับในที่ร้อนสลับเย็น (เก็บในตู้เย็น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 รอบ) | 68 |
| 33 ความคงตัวทางเคมีเมื่อเก็บตำรับในที่ร้อนสลับเย็น (เก็บในตู้เย็น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 รอบ) | 69 |

สารบัญแผนภูมิ

| แผนภูมิที่ | หน้า |
|------------|------|
| 1 | 6 |
| 2 | 10 |
| 3 | 14 |
| 4 | 30 |
| 5 | 31 |
| 6 | 42 |
| 7 | 47 |
| 8 | 47 |
| 9 | 50 |
| 10 | 50 |
| 11 | 51 |
| 12 | 51 |
| 13 | 52 |
| 14 | 52 |
| 15 | 53 |
| 16 | 53 |
| 17 | 63 |
| 18 | 65 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 1 ภาพตัดขวางของโครงสร้างผิวหนังที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ Epidermis, Dermis และ Subcutaneous | 5 |
| 2 ตำแหน่งของเมลานोไซต์ที่อยู่ในชั้นอีพิเดอร์มิสของผิวหนัง | 5 |
| 3 โครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี | 8 |
| 4 โครงสร้างทางเคมีของโคจิกแอซิด | 8 |
| 5 โครงสร้างทางเคมีของไนอาซินาไมด์ | 11 |
| 6 โครงสร้างทางเคมีของเมลานโทนิน | 12 |
| 7 โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน | 13 |
| 8 Chromatogram ของสารละลายสกัดจากตำรับและสารละลายมาตรฐาน | 28 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

สีผิวของมนุษย์ที่ปรากฏขึ้นนั้น เป็นผลมาจากกระบวนการสร้างและการกระจายตัวของสารเมลานิน (melanin) ในเซลล์ผิว เมลานินแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ eumelanins และ pheomelanins ซึ่ง eumelanins จะทำให้ปรากฏสีน้ำตาลหรือสีดำ ส่วน pheomelanins จะทำให้ปรากฏสีแดงหรือสีเหลือง กระบวนการสร้างเมลานินจะเกิดในเมลานोไซต์ (melanocyte) โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งเปลี่ยน tyrosine ให้เป็นเมลานิน เมลานินมีหน้าที่ป้องกันผิวหนังและเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงไปใผิวหนังจากการทำร้ายของรังสียูวี อย่างไรก็ตามการสร้างเมลานินที่มากเกินไปและการสะสมเมลานินที่มากเกินไปในผิวหนัง อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังคล้ำเสีย (hyperpigmentation) เช่น ฝ้า (melasma) กระ (freckles) และจุดเม็ดสีในผู้สูงอายุ (geriatric pigment spots) นอกจากนี้การถูกกระตุ้นด้วยรังสีอุลตราไวโอเล็ต (ultra-violet light exposure) ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเม็ดสี (pigment abnormalities) ได้เช่นกัน (1)

การรักษา hyperpigmentation ต้องใช้สารที่มีคุณสมบัติสามารถบวกรสร้างเม็ดสีของเมลานิน ซึ่งสารที่มีประสิทธิภาพในการรักษา hyperpigmentation และเป็นที่รู้จักกันดีคือ hydroquinone ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเมลานิน ถึงแม้ว่าการใช้ hydroquinone จะให้ผลดีในการรักษาแต่การใช้เป็นระยะเวลานานก็มีผลข้างเคียงที่ตามมาอย่างมากด้วยเช่นกัน ซึ่งผลข้างเคียงและอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ hydroquinone ที่พบมากและบ่อยที่สุดก็คือ irritation และ erythema (2) ปัจจุบันจึงได้มีการค้นหา whitening agents ชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ได้ในระยะยาว และมีอาการข้างเคียงน้อยที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่สกัดได้จากพืช เช่น kojic acid, arbutin, licorice, ascorbic acid, mulberry และ soy (3)

วิตามินบีสาม (vitamin B₃) หรือไนอาซิनाไมด์ (niacinamide) เป็นอนุพันธ์ของ niacin ที่ร่างกายได้รับทางอาหาร เช่น เนื้อสัตว์ นม ไข่ และถั่ว เป็นต้น ไนอาซิनाไมด์เป็นหนึ่งในวิตามินที่นิยมนำมาเป็นส่วนผสมทางเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านการเกิดสิว (antiacne) และยังสามารถเพิ่มกระบวนการสร้างคอลลาเจนได้อีกด้วย ส่วนอีกหนึ่งคุณสมบัติที่กำลังได้รับความสนใจก็คือ การนำไนอาซิनाไมด์มาใช้รักษา hyperpigmentation เนื่องจากไนอาซิनाไมด์ สามารถลดการสร้างเมลานินโดยยับยั้ง

กระบวนการขนส่ง melanosome จาก melanocyte ไปยัง keratinocytes ซึ่งในทาง cosmeceutical products จะใช้ความเข้มข้นของไนอาซิनाไมด์ อยู่ในช่วง 3.5-5% (4, 5)

คาเฟอีน (caffeine) เป็นสารชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง สามารถพบในเครื่องดื่มประเภทชาหรือกาแฟ แต่ในทางเครื่องสำอางคาเฟอีนมีคุณสมบัติลดการสร้างเซลล์ลูไลต์ (cellulite) เนื่องจากคาเฟอีนนั้นสามารถป้องกันการสะสมของไขมันส่วนเกินภายในเซลล์ สามารถป้องกันเซลล์จากรังสียูวี และยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถนำมาเป็นสารต้านริ้วรอยแห่งวัยได้ (6)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการปลดปล่อยของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับ ที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ตำรับ เพื่อเปรียบเทียบว่าส่วนประกอบและชนิดของตำรับมีผลต่อการปลดปล่อยไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนหรือไม่อย่างไร รวมถึงศึกษาความคงตัวของแต่ละตำรับ การวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ในการพัฒนาตำรับทาผิวเพื่อให้มีประสิทธิภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมตำรับครีมและเจลที่บรรจุไนอาซิनाไมด์ (วิตามินบี3) และคาเฟอีน
2. เพื่อศึกษาการปลดปล่อยไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับชนิดต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนในแต่ละตำรับ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมตำรับที่บรรจุไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนลงไปในยาพื้นชนิดต่าง ๆ ได้แก่
 - 1) Vanishing cream
 - 2) Hydrophilic emulsion
 - 3) Cold cream
 - 4) Gel
2. วิเคราะห์หาปริมาณไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนในแต่ละตำรับด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)
3. ประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับ ได้แก่ ลักษณะภายนอก ค่า pH และความหนืด
4. ศึกษาการปลดปล่อยของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับชนิดต่าง ๆ ใน 24 ชั่วโมง โดยใช้ Modified Franz-diffusion cells
5. ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีที่สภาวะต่าง ๆ
 - 1) เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน

- 2) เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์ 75% (45°C/75% RH) เป็นระยะเวลา 6 เดือน
- 3) เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน
- 4) เก็บในที่ร้อนสลับเย็น คือ เก็บในตู้เย็น (4-8°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้อบ (45°C/75% RH) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 cycles

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ตำรับที่บรรจุโนอาชีนาไมด์และคาเฟอีนในเบสชนิดต่าง ๆ
2. ทราบคุณลักษณะทางกายภาพ และความคงตัวของแต่ละตำรับ
3. รู้ค่าการปลดปล่อยของโนอาชีนาไมด์และคาเฟอีนจากตำรับ ทั้ง 4 ตำรับ
4. ได้ชนิดของตำรับที่ให้ผลการปลดปล่อยดี และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาตำรับ ทาผิวที่มีประสิทธิภาพได้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

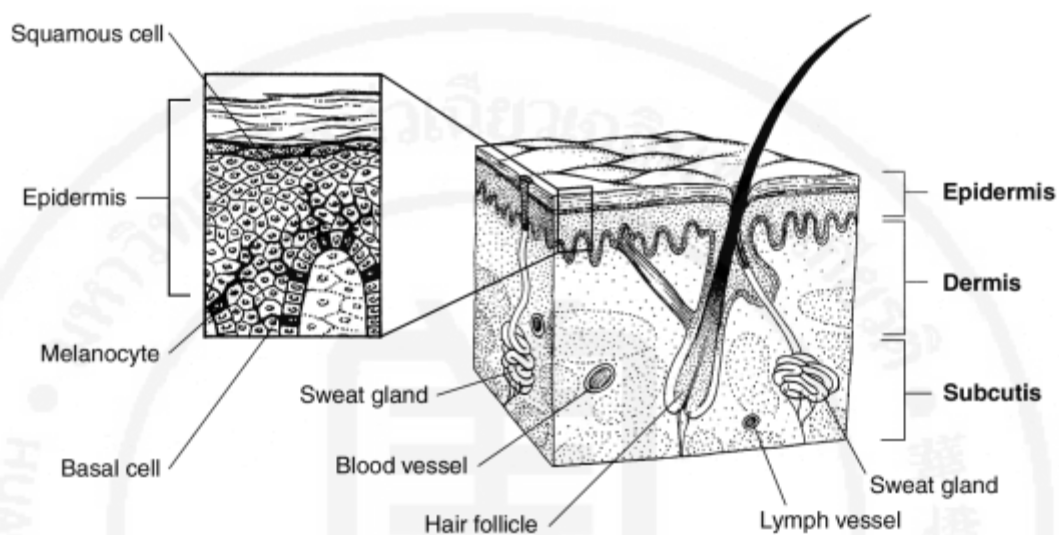
การศึกษาเรื่องการปลดปล่อยและตรวจสอบความคงตัวของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีน จากตำรับทาผิวชนิดต่าง ๆ ผู้วิจัยได้ค้นคว้ารายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับทฤษฎี แนวคิดต่าง ๆ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องสรุปได้ดังนี้

2.1 เมลานิน

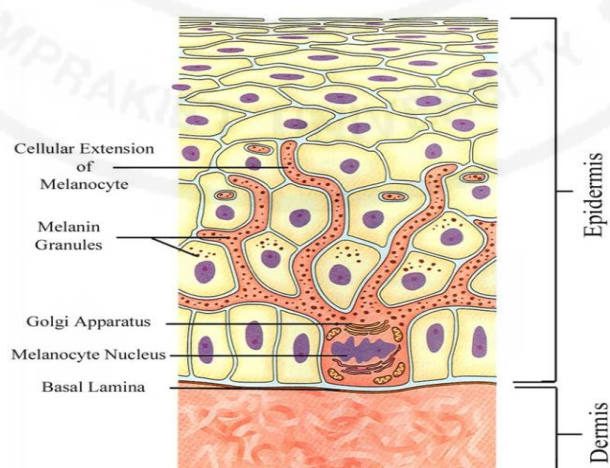
การสร้างเมลานินในชั้นผิวหนัง มีผลต่อการปรากฏสีผิวของมนุษย์ เมลานินนั้นจะถูกสร้างโดยเซลล์ที่มีชื่อว่า เมลาโนไซต์ (melanocytes) ซึ่งจะอยู่ในชั้นเดอร์มิส (dermis) ของผิวหนัง แล้วจะถูกเมลาโนโซม (melanosome) ทำหน้าที่ขนส่งเมลานินไปยัง เคอรัทีโนไซต์ (keratinocytes) ของผิวหนังชั้น อีพิดERMิส (epidermis) ซึ่งเป็นผิวหนังชั้นบนสุด

การสังเคราะห์เมลานินจะเริ่มจากไทโรซีน (tyrosin) ถูกเปลี่ยนเป็นไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน (dihydroxyphenylalanine, DOPA) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) จากนั้นไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน ก็จะถูกเปลี่ยนเป็นโดพาควิโนน (DOPA quinone) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสเช่นกัน โดพาควิโนน ที่ได้จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นสองกรณีด้วยกันคือ กรณีแรก โดพาควิโนนจะเปลี่ยนเป็นโดพาโครม (DOPA chrome) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (auto oxidation) จนสุดท้ายจะได้ไดไฮดรอกซีอินโดล (5, 6-dihydroxyindole) หรือไดไฮดรอกซีอินโดล-2-คาร์บอกซิลิก แอซิด (DHICA) เพื่อสร้างยูเมลานิน (eumelanin) ที่จะทำให้เกิดการปรากฏเม็ดสีสีน้ำตาล-ดำ ส่วนกรณีที่สอง โดพาควิโนนจะทำปฏิกิริยากับซิสทีอีน (cysteine) หรือกลูต้าไธโอน (glutathione) กลายเป็นซิสทีนิลโดพา (cysteinyl DOPA) หรือกลูต้าไธโอนโดพา (glutathione DOPA) เพื่อสร้างฟีโอเมลานิน (pheomelanin) ที่จะทำให้เกิดการปรากฏเม็ดสีสีเหลือง-แดง ซึ่งจากกลไกการสร้างเมลานิน จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสำคัญเป็นอย่างมากและเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยา (rate-limiting enzyme) ในการสร้างเมลานินอีกด้วย (1)

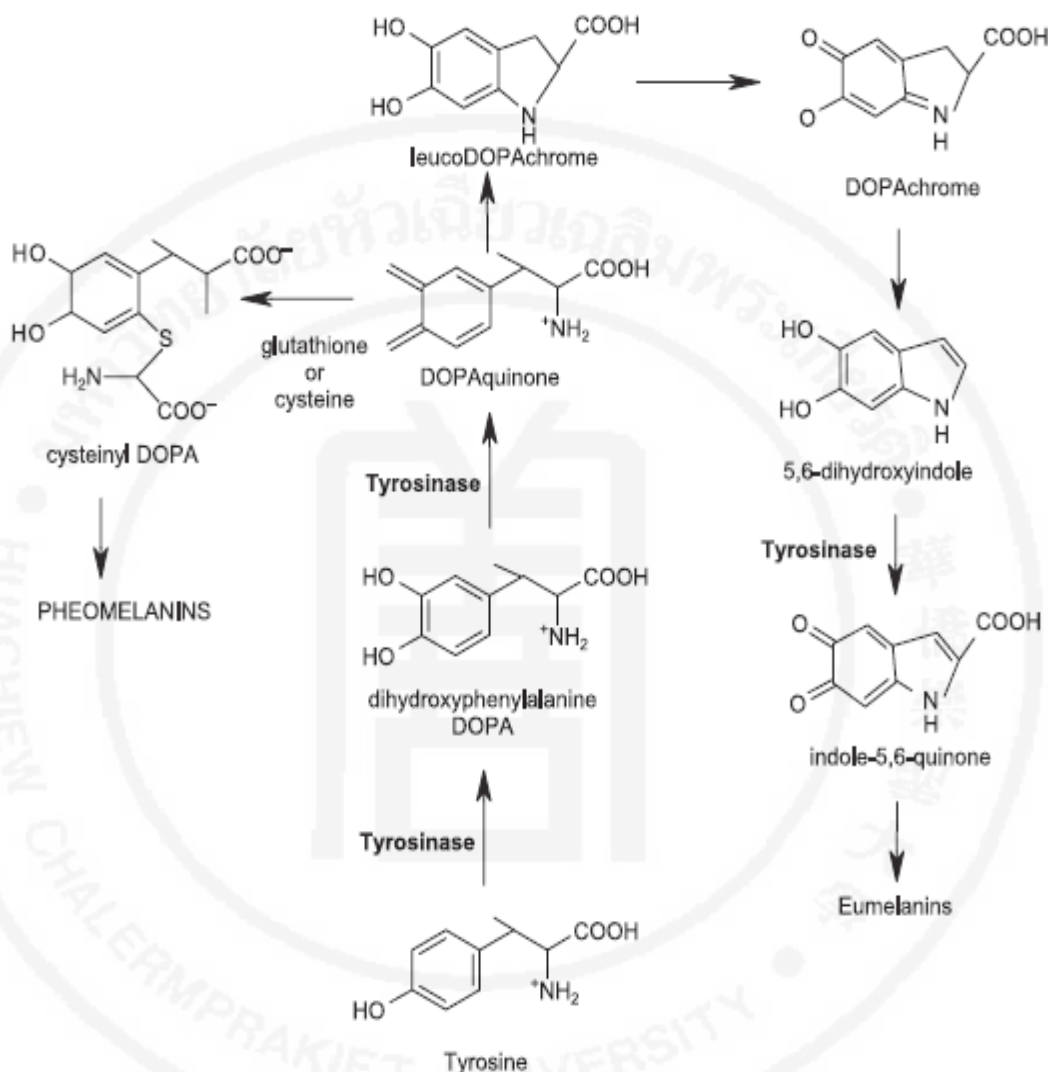
ภาพที่ 1 ภาพตัดขวางของโครงสร้างผิวหนังที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ Epidermis, Dermis และ Subcutaneous (7)



ภาพที่ 2 ตำแหน่งของเมลานินไซท์ที่อยู่ในชั้นอีพิเดอร์มิสของผิวหนัง (8)



แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการสังเคราะห์เมลานิน ทั้งชนิด ยูเมลานิน และ พีโอเมลานิน (1)



เมลานินมีหน้าที่ป้องกันผิวหนังและเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงไป (underlying tissue) จากรังสียูวีที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของผิวหนัง (skin injury) อย่างไรก็ตามการสร้างเมลานินและการสะสมเมลานินในผิวหนังที่มากเกินไปเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด hyperpigmentation skin disorders เช่น melasma, freckles และ geriatric pigment spots เป็นต้น นอกจากนั้นการถูกกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความไม่สมดุลของฮอร์โมนในร่างกายก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสร้างเม็ดสีที่ผิดปกติ (pigment abnormalities) ได้เช่นกัน (5) นอกจากการสร้างเม็ดสีที่ผิดปกติแล้ว การเกิด post inflammatory hyperpigmentation รวมทั้ง acne, eczema ก็เป็นปัญหาทางผิวหนังได้ (1)

2.2 การรักษา Hyperpigmentation

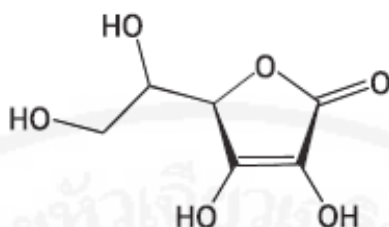
สารที่เป็นที่รู้จักกันดีและให้ผลดีในการรักษา hyperpigmentation คือ ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ซึ่งสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินโดยมีกลไกคือ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) ถึงแม้ว่าไฮโดรควิโนนจะให้การรักษาที่ดี แต่การใช้ในระยะยาว จะทำให้เกิด hypopigmentation ได้ นอกจากนั้นการใช้ไฮโดรควิโนนยังทำให้เกิดผลข้างเคียง ซึ่งผลข้างเคียงที่พบได้บ่อย คือ irritation และ erythema จึงมีการศึกษาวิจัยแนวทางเลือกใหม่ถึงสารที่ให้ผลดีในการรักษา hyperpigmentation และมีความปลอดภัยสำหรับการใช้ในระยะยาว (2)

ตัวอย่างสารที่ใช้สำหรับทำให้หน้าขาว (Topical whitening agents) มีดังต่อไปนี้

1. วิตามินซี (Vitamin C)

วิตามินซี เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ (9) ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ จึงจำเป็นต้องรับเข้ามาจากสารอาหารที่รับประทานเข้าไป (4) เช่น ผักและผลไม้ วิตามินซีมีความสำคัญต่อร่างกาย เพราะมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen production) (9) ยับยั้งไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) มีผลทำให้ลดการสร้างเมลานินของผิวหนัง จึงได้มีการนำวิตามินซีมาใช้เป็น whitening agent ในทางเครื่องสำอาง (10) แต่เนื่องจากวิตามินซีไม่คงตัว สลายตัวได้ง่ายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เมื่อสัมผัสกับอากาศ จึงมีการใช้ออนุพันธ์ของวิตามินซี (ascorbic acid derivatives) แทน ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าอนุพันธ์ของวิตามินซีมีความคงตัวมากกว่าวิตามินซี อีกทั้งยังสามารถซึมผ่านเข้าผิวหนังได้มากกว่าวิตามินซี และอนุพันธ์ของวิตามินซีที่มีการนิยมนำมาใช้มากที่สุดก็คือ magnesium ascorbyl phosphate และ ascorbyl-6-palmitate (4) มีงานวิจัยรายงานว่าเมื่อใช้ครีมทาเฉพาะที่ 5% ของวิตามินซี เปรียบเทียบกับ 4% ของไฮโดรควิโนนในคนที่ เป็นฝ้า ผลปรากฏว่ากลุ่มคนที่ใช้ไฮโดรควิโนนจะให้ผลการรักษาที่ดีกว่า คือ สามารถลดเม็ดสีจากฝ้าได้ถึง 93% เมื่อเทียบกับกลุ่มคนที่ใช้วิตามินซีซึ่งได้ผลเพียง 62.5% และกลุ่มคนที่ใช้ไฮโดรควิโนนจะสามารถเห็นผลได้ในเดือนแรกของการรักษา ในขณะที่กลุ่มคนที่ใช้วิตามินซีจะสามารถเห็นผลได้หลังจากใช้เป็นเวลา 3 เดือน (2) ถึงแม้ว่าการใช้ไฮโดรควิโนนจะให้ผลการรักษาที่ดีแต่ในด้านการเกิดอาการไม่พึงประสงค์พบว่า กลุ่มคนที่ใช้ไฮโดรควิโนนจะเกิดอาการไม่พึงประสงค์มากถึง 68% เมื่อเทียบกับกลุ่มคนที่ใช้วิตามินซี ซึ่งจะพบอาการไม่พึงประสงค์เพียง 6.2% (11)

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี (1)

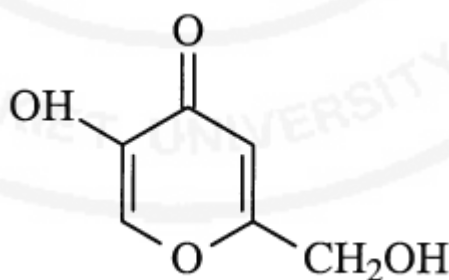


2. โคจิกแอซิด (Kojic acid)

โคจิกแอซิดเป็นอนุพันธ์ของเชื้อรา ที่ได้จาก *Aspergillus* และ *Penicillium* species

- (12) ซึ่งได้รับความนิยมและใช้กันอย่างกว้างในประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน จึงนำมาใช้เป็นสารที่ทำให้ผิวหน้ากระจ่างใส (skin-lightening agent)
- (1)

ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของโคจิกแอซิด (13)



3. ถั่วเหลือง (Soy)

สารสกัดจากถั่วเหลืองกำลังเป็นที่สนใจในด้านเครื่องสำอาง เพราะมีส่วนประกอบของโปรตีนขนาดเล็กและมีไอโซฟลาโวน (isoflavone) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์และโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ในเพศหญิง (3) สารสกัดจากถั่วเหลืองสามารถลดการสังเคราะห์เมลานิน

โดยมีกลไก คือ ยับยั้ง protease-activated receptor-2 (PAR-2) ซึ่งมีผลในการยับยั้งกระบวนการขนส่งเมลานินโดยเมลาโนโซม (1-3) เป็นกลไกที่แตกต่างจากไฮโดรควิโนโนนและโคจิกแอซิด (1) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็น serine protease inhibitor ที่สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิวคล้ำเสียที่เกิดจากการถูกรังสียูวีบี (UVB) ได้ มีรายงานวิจัยรายงานว่า การใช้เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากถั่วเหลือง โดยทดลองกับผู้หญิงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จำนวน 30 คน โดยทาวันละ 2 ครั้ง หลังจากใช้เป็นเวลา 2 เดือน ผลปรากฏว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองสามารถทำให้เม็ดสีจางลงและมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (3)

4. ชะเอม (Licorice)

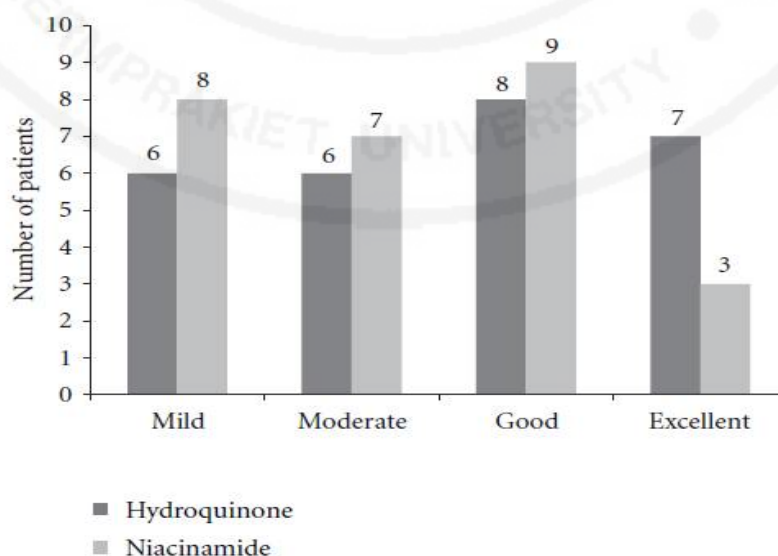
สารสกัดจากชะเอมได้มาจากรากของ glycyrrhiza glabra สารสำคัญหลัก ๆ ที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดจากชะเอมคือ glabridin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) และยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงนำมาใช้รักษา hyperpigmentation ได้ (2, 3) มีรายงานวิจัยรายงานว่า การใช้ครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชะเอม โดยทดลองกับคนที่เป็นฝ้า (melasma) จำนวน 20 คน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชะเอมสามารถลดเม็ดสีที่เกิดจากฝ้าได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใช้ครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชะเอม) และยังสามารถใช้กับคนที่ผิวบอบบางหรือผิวแพ้ง่ายได้อีกด้วย (12)

5. ไนอาซิनाไมด์ (Niacinamide) หรือวิตามินบีสาม (Vitamin B₃)

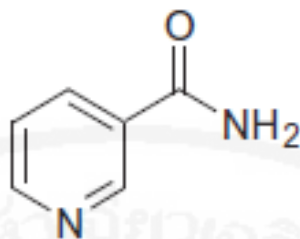
ไนอาซิनाไมด์หรือวิตามินบีสามเป็นอนุพันธ์ของไนอาซิน (derivative of niacin) ซึ่งร่างกายจะได้รับจากสารอาหารที่รับประทานเข้าไป เช่น เนื้อสัตว์ นม ไข่ และถั่ว เป็นต้น ไนอาซินจะเป็นที่รู้จักกันดีในวงการทางการแพทย์และนำมาทำเป็นยาลดไขมัน เพราะคุณสมบัติที่สามารถลดโคเรสเตอรอลได้ (4) นอกจากนั้นไนอาซิनाไมด์ยังเป็นหนึ่งในวิตามินที่กำลังได้รับความนิยมนำมาใช้ในทางเครื่องสำอางเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (10, 14) ด้านการอักเสบ ด้านการเกิดสิว (4, 9, 15) ป้องกันผิวแห้งจากการถูกทำร้ายจากรังสี UV (15) และยังสามารถเพิ่มกระบวนการสร้าง collagen ได้อีกด้วย ส่วนอีกหนึ่งคุณสมบัติที่กำลังได้รับความสนใจก็คือ การนำไนอาซิनाไมด์ มาใช้ในการรักษา hyperpigmentation เนื่องจากไนอาซิनाไมด์ สามารถลดการสร้างเมลานินโดยยับยั้งกระบวนการขนส่ง melanosome จาก melanocyte ไปยัง keratinocytes (4, 5) ไนอาซิनाไมด์จากตำรับทาผิวสามารถลดการสูญเสียน้ำจากผิวแห้งและทำให้ริ้วรอยที่ผิวแห้งตื้นขึ้น (14, 16) ด้านฤทธิ์ของการต้านอักเสบนั้น มีงานวิจัยรายงานว่าเมื่อใช้ 4% ของไนอาซิनाไมด์เจล มารักษาในกลุ่มคนที่เป็นสิวพบว่าให้ผลที่ดีเทียบเท่ากับการรักษาด้วย 1% คลินดาไมซินเจล (4) การใช้ 4% ของไนอาซิनाไมด์เจลมารักษาในผู้ที่ เป็นสิวอุดตันและสิวกอักเสบ พบว่าคนที่เข้ารับรักษาจำนวน 38 คน จากการเข้ารับการรักษาทั้งหมด 41 คน ประสบความสำเร็จในการรักษา ซึ่ง 4% ไนอาซิनाไมด์

เจลสามารถลดจำนวนของสิวได้อย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ (17) จากคุณสมบัติของไนอาซิनाไมด์ที่สามารถลดกระบวนการสร้างเมลานิน จึงทำให้มีการใช้ไนอาซิनाไมด์มารักษารอยดําบนใบหน้า กระและฝ้า เป็นต้น ในการศึกษาที่ผู้ป่วนพบว่าการใช้ไนอาซิनाไมด์แบบทาเฉพาะที่ (topical niacinamide) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถลดรอยดําได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle control) (10) มีงานวิจัยรายงานว่าในกลุ่มคนที่เป้นฝ้าจำนวน 27 คน เข้ารับการรักษาโดยใช้ 4% ของไนอาซิनाไมด์ครีม (niacinamide cream) เปรียบเทียบกับการใช้ 4% ของไฮโดรควิโนโนนครีม (hydroquinone cream) โดยทา 4% ของไนอาซิनाไมด์ครีมเพียงครั้งหนึ่งของใบหน้า และทาใบหน้าอีกครั้งหนึ่งที่เหลือด้วย 4% ของไฮโดรควิโนโนนครีม รักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าทั้ง 4% ของไนอาซิनाไมด์ครีมและ 4% ของไฮโดรควิโนโนนครีมสามารถลดความเข้มของเม็ดสีที่เกิดจากฝ้าได้ทั้งคู่ โดยประสิทธิภาพในการรักษาของ 4% ของไฮโดรควิโนโนนครีมจะเป็น 55% เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของ 4% ของไนอาซิनाไมด์ครีมที่ได้ 44% แต่ในด้านการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จะพบมากในบริเวณที่ใช้ 4% ของไฮโดรควิโนโนนครีม ซึ่งสรุปได้ว่าการใช้ 4% ของไนอาซิनाไมด์ครีมจะให้ผลดีและมีความปลอดภัยในการรักษา hyperpigmentation (18)

แผนภูมิที่ 2 ประสิทธิภาพของการใช้ไฮโดรควิโนโนนและไนอาซิनाไมด์ในการรักษาฝ้า (18)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของไนอาซิनाไมด์ (19)



2.3 รอยเหี่ยวย่น (Wrinkle)

ริ้วรอยหรือรอยเหี่ยวย่นที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหนัง เป็นเรื่องปกติที่จะพบได้เมื่อมีอายุที่เพิ่มมากขึ้น แต่ริ้วรอยที่เกิดก่อนวัยอันควรอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ซึ่งสาเหตุหลัก ๆ คือ แสงแดด การที่ผิวหนังสัมผัสแสงแดดเป็นระยะเวลานานจะทำให้ร่างกายกระตุ้น matrix metalloproteinases (MMPs) ทำให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างการสร้างและการทำลายคอลลาเจนในผิวหนังชั้นเดอร์มิส เกิดการทำลายอีลาสติกไฟเบอร์ (elastic fiber) ผิวหนังจึงมีความยืดหยุ่นน้อยลง (20) หรือการแสดงอารมณ์ทางสีหน้าที่มากเกินไป เช่น การหัวเราะ การขมวดคิ้ว จะทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อบริเวณใบหน้า เกิดเป็นเส้นริ้วรอยต่าง ๆ บนใบหน้าได้ (21)

ตัวอย่างสารที่ใช้สำหรับลดเลือนริ้วรอย (Antiwrinkle)

1. วิตามินอี (Vitamin E)

เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำมัน สามารถพบในอาหารหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น ถั่ว ถั่วเหลือง และผักใบเขียว เป็นต้น มีรายงานว่าวิตามินอีมีประโยชน์สูงมากสำหรับดวงตาและระบบไหลเวียนของเลือด เพราะสามารถลด lipid peroxidation ได้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก (9) เป็นวิตามินที่นำมาเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางที่แสดงคุณสมบัติในด้านการลดเลือนริ้วรอยและสามารถช่วยแก้ปัญหาของผิวที่ถูกทำร้ายจากแสงแดดได้ มีงานวิจัยรายงานว่า เมื่อใช้ 5% topical vitamin E เป็นเวลา 4 เดือน สามารถลดริ้วรอยได้รอบดวงตาและลดการอักเสบของผิวหลังจากถูกทำร้ายโดยแสงแดดได้ (10) นอกจากนั้นการใช้ topical vitamin E ยังเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและสามารถลดการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่น การระคายเคือง (irritation) ได้อีกด้วย (22)

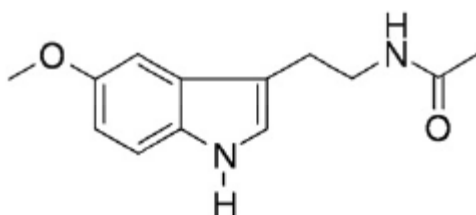
2. ไฮยาลูรอนิกแอซิด (Hyaluronic acid)

เป็นสารที่พบได้ในร่างกายมนุษย์ เช่น ตามวุ้นในโพรงลูกตา กล้ามเนื้อ และน้ำหล่อลื่นข้อต่อต่าง ๆ เป็นต้น มีลักษณะเป็นวุ้นอยู่ระหว่างคอลลาเจนและอีลาสตินไฟเบอร์ ช่วยลำเลียงสารอาหารที่จำเป็นจากกระแสเลือดไปยังเซลล์ต่าง ๆ ช่วยทำให้ผิวชุ่มชื้นเพราะมีคุณสมบัติกักเก็บน้ำไว้ได้ผิวหนังไฮยาลูรอนิกแอซิดจัดเป็นสารประเภท glycosaminoglycan ซึ่งมีหน้าที่หลัก ๆ คือ ด้านการอักเสบและการบวมน้ำ ช่วยรักษาระดับน้ำในร่างกาย เต็มสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการของร่างกายและลำเลียงไปยังโมเลกุล (23) เมื่ออายุมากขึ้น ระดับการสร้างไฮยาลูรอนิกแอซิดของร่างกายจะลดลง ผิวหนังเกิดการสูญเสียน้ำได้มากขึ้น จึงทำให้เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นตามผิวหนังต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีการใช้ไฮยาลูรอนิกแอซิดอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางดูแลผิวและรักษา ริ้วรอย ทำให้ผิวมีสุขภาพที่ดีและแลดูอ่อนวัย (24)

3. เมลาโทนิน (Melatonin)

เป็นฮอร์โมนที่ถูกสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) โดยมีการสร้างขึ้นที่ต่อมไพเนียล เรตินา ลำไส้ใหญ่ ผิวหนัง และไขกระดูก การหลั่งเมลาโทนินจะมีความมืดเป็นตัวกระตุ้นและจะหยุดหลั่งเมื่อเจอแสงสว่าง เป็นฮอร์โมนแห่งการนอนหลับ เมื่ออายุมากขึ้น ร่างกายจะสร้างเมลาโทนินน้อยลง และพบว่าในผู้สูงอายุการสร้างเมลาโทนินจะลดลงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เวลานอนของผู้สูงอายุโดยเฉลี่ยแล้วลดน้อยลงและมีปัญหาเกี่ยวกับการนอนหลับ คือนอนหลับยาก นอนไม่หลับ หรือนอนแล้วตื่นขึ้นมากกลางดึก ดังนั้นจึงได้มีการใช้เมลาโทนินมาช่วยในเรื่องของการนอนไม่หลับ ช่วยบรรเทาอาการเพลียหลังจากโดยสารเครื่องบิน (jet-lag) การรับประทานเมลาโทนินขนาด 0.5 mg – 5.0 mg ก่อนนอน จะช่วยให้การนอนหลับเข้าสู่ภาวะปกติได้ดีขึ้น นอนจากนี้ยังช่วยควบคุมระดับความดันโลหิตของร่างกาย เพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถป้องกันมะเร็งและชะลอริ้วรอยแห่งวัยได้ (25)

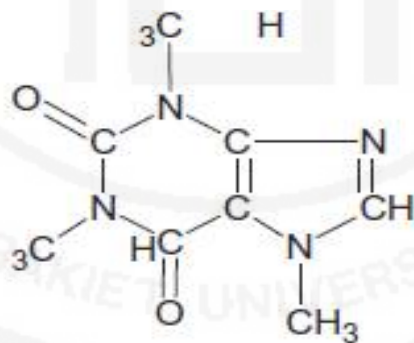
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของเมลาโทนิน (26)



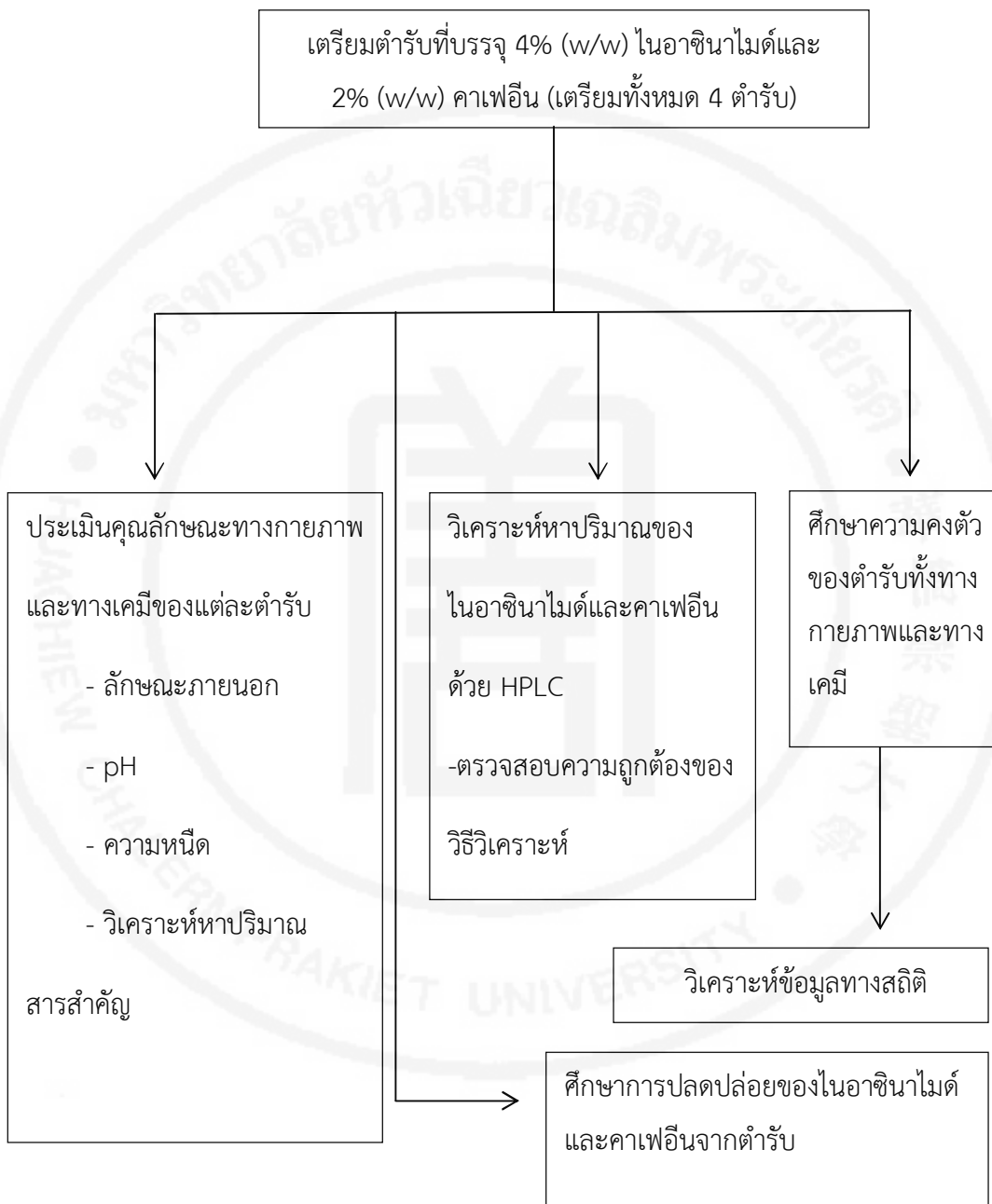
4. คาเฟอีน (Caffeine)

คาเฟอีนเป็นสารแซนทีนอัลคาลอยด์ ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด ได้แก่ ชา เมล็ดกาแฟ เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของกาแฟ จัดเป็นสารกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและระบบเมแทบอลิซึมหรือกลไกเผาผลาญสารอาหารในร่างกาย เพื่อลดความง่วง ความเหนื่อยล้า และจะส่งผลกระตุ้นเส้นประสาทเพิ่มการตื่นตัวของร่างกาย (27) มีผลต่อการสร้างสารเมลาโทนินในร่างกายมนุษย์ (28) สามารถป้องกันการเกิด LDL oxidation (29) นอกจากนี้คาเฟอีนยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสร้างและสะสมไตรกลีเซอไรด์ของเนื้อเยื่อไขมัน ดังนั้นคาเฟอีนจึงมีคุณสมบัติในการสลายไขมันที่สะสมในชั้นผิวหนัง ส่งผลให้บริเวณที่ถูกสลายไขมันมีความกระชับและยืดหยุ่นดีขึ้น ในทางเครื่องสำอางจึงได้มีการนำคาเฟอีนมาใช้ในครีมกระชับสัดส่วน ลดเซลลูไลท์ ลดริ้วรอยรอบดวงตา ช่วยให้ถุงใต้ตาลดบวมและยกกระชับขึ้น (6, 30)

ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน (31)



แผนภูมิที่ 3 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย



บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการเตรียมตำรับทาผิวเพื่อช่วยให้ผิวขาวและลดเลือนริ้วรอย ที่ประกอบด้วย ไนอาซิनाไมด์ (วิตามินบี 3) และคาเฟอีน (caffeine) ในตำรับ โดยทำการศึกษาในตำรับทาผิว 4 ตำรับ คือ วานิชิงครีม (vanishing cream) ไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน (hydrophilic emulsion) โคลด์ครีม (cold cream) และเจล (gel) จากนั้นนำทั้ง 4 ตำรับมาศึกษาและประเมินลักษณะทางกายภาพ ชีตความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความหนืด และทำการศึกษาการปลดปล่อยของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับชนิดต่าง ๆ และศึกษาความคงตัวของตำรับเมื่อเก็บในสภาวะต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 6 เดือน และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการศึกษาการปลดปล่อยตัวจากตำรับและการศึกษาความคงตัวของตำรับนั้น จะต้องมีการวิเคราะห์ปริมาณของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน ในการศึกษานี้จะใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ซึ่งจะต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ในหัวข้อดังนี้ คือ

- ความเฉพาะเจาะจง (Specificity)
- ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)
- ความแม่นยำ (Accuracy)
- ความเที่ยง (Precision)
- ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness)

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) (Thermo Electron Corporation, U.S.A.)
- 2) Homogenizer (Silverson L4RT)
- 3) อุปกรณ์ศึกษาการปลดปล่อยของสารสำคัญ Franz diffusion cell (PermeGear, USA)
- 4) เครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- 5) เครื่องวัดความหนืด (Brookfield®; รุ่น LVDII+)
- 6) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 45 °C, 75% RH (WTB binder, Germany)
- 7) ตู้เย็น 4 °C
- 8) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Adventure™ OHAUS)
- 9) เตาให้ความร้อน (hot plate)
- 10) บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
- 11) หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร
- 12) แท่งแก้วคน (stirring rod)
- 13) กระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 (Whatman no.1)
- 14) ไมโครปิเปต (micropipette)
- 15) กรวยกรอง (funnel)
- 16) ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร
- 17) หลอดหยด (dropper)
- 18) กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 25, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 19) เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
- 20) เครื่องกรองระบบสุญญากาศ
- 21) กระดาษกรอง cellulose acetate ขนาดรูเปิด 0.45 µm
- 22) กระดาษเซลโลเฟน (Membrane Filtration Products, Inc USA)
- 23) ตู้อบเครื่องแก้ว

2. วัตถุดิบและสารเคมี

- 1) Niacinamide (Chemico Inter Corporation Co., Ltd)
- 2) Caffeine (Fluka, Germany)
- 3) Methanol HPLC grade (Fisher Scientific)
- 4) Sodium 1-heptanesulfonate (Fluka, Germany)
- 5) Cetyl alcohol
- 6) White beeswax
- 7) Mineral oil
- 8) Stearic acid
- 9) Sweet almond oil
- 10) Propylene glycol
- 11) Glycerin
- 12) Triethanolamine
- 13) Sodium borate
- 14) Methyl paraben
- 15) Propyl paraben
- 16) Carbopol 940
- 17) Citric acid
- 18) น้ำปราศจากไอออน (DI water)

3.2 วิธีการศึกษาวิจัย

1. การเตรียมตำรับทาผิวที่บรรจุในอาซิनाไมด์และคาเฟอีน

การเตรียมตำรับที่บรรจุในอาซิनाไมด์และคาเฟอีน ทำการเตรียมทั้งหมด 4 ตำรับ ดังมีส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 1 มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้

1) การเตรียมตำรับเจล (Gel)

การเตรียมตำรับเจลเริ่มจากการกระจายคาร์โบพอล โดยค่อย ๆ โพรยคาร์โบพอลลงในน้ำปราศจากไอออน คนเบา ๆ แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้คาร์โบพอลกระจายตัวจนหมด จากนั้นนำกลีเซอริน โพรพิลีนไกลคอล กรดซิตริก และไนอาซิनाไมด์ มาละลายในน้ำปราศจากไอออน แล้วผสมกัน ส่วนคาเฟอีน เมธิลพาราเบน และโพรพิลพาราเบน จะนำมาละลายน้ำปราศจากไอออน แล้วให้ความร้อนจนสารละลายละลายจนหมด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปผสมกับ

สารละลายในส่วนแรก คนให้เข้ากัน แล้วหยดไตรเอทานอลามีน จนค่ารับมี pH ประมาณ 6.5 แล้วบรรจุเจลใส่กระปุกพลาสติกที่ปิดสนิท

2) การเตรียมตำรับวานิชิงครีม (Vanishing cream)

ตำรับวานิชิงครีมเป็นตำรับที่มีชนิดของครีมเบสเป็นชนิด น้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งการเตรียมตำรับนี้เริ่มจากการนำวัฏภาคน้ำมันซึ่งประกอบด้วย ไขผึ้ง น้ำมันมิเนอรล์ และกรดสเตียริก มาผสมและนำมาให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำวัฏภาคน้ำซึ่งประกอบด้วย กลีเซอริน โซเดียมบอเรต เมทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน คาเฟอีน และน้ำ มาผสมแล้วให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นให้เทวัฏภาคน้ำลงไปผสมกับวัฏภาคน้ำมันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์จนอุณหภูมิเย็นลง ส่วนสารละลายในอาซิनाไมด์ (ละลายในอาซิनाไมด์ 1 กรัมในน้ำ 1.5 มิลลิลิตร) ให้ใส่ลงไปขณะที่ครีมกำลังผสมอยู่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเสร็จแล้วบรรจุครีมใส่กระปุกพลาสติกที่ปิดสนิท

3) การเตรียมตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน (Hydrophilic emulsion)

ตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน เป็นตำรับที่มีชนิดของครีมเบสเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งการเตรียมตำรับนี้เริ่มจากการนำวัฏภาคน้ำมันซึ่งประกอบด้วย ซีทิลแอลกอฮอล์ ไขผึ้ง กรดสเตียริก และน้ำมันอัลมอลด์ มาผสมและนำมาให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำวัฏภาคน้ำซึ่งประกอบด้วย โพรพิลีนไกลคอล ไตรเอทานอลามีน เมทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน คาเฟอีน และน้ำมาผสมแล้วให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นให้เทวัฏภาคน้ำลงไปผสมกับวัฏภาคน้ำมันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ จนอุณหภูมิเย็นลง ส่วนสารละลายในอาซิनाไมด์ (ละลายในอาซิनाไมด์ 1 กรัมในน้ำ 1.5 มิลลิลิตร) ให้ใส่ลงไปขณะที่ครีมที่กำลังผสมอยู่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเสร็จแล้วบรรจุครีมใส่กระปุกพลาสติกที่ปิดสนิท

4) การเตรียมตำรับโคลด์ครีม (Cold cream)

ตำรับโคลด์ครีมเป็นตำรับที่มีชนิดของครีมเบสเป็นชนิด น้ำในน้ำมัน (W/O) ซึ่งการเตรียมตำรับนี้เริ่มจากการนำวัฏภาคน้ำมันซึ่งประกอบด้วย ไขผึ้ง น้ำมันมิเนอรล์ และกรดสเตียริก มาผสมและนำมาให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำวัฏภาคน้ำซึ่งประกอบด้วย โซเดียมบอเรต เมทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน คาเฟอีน และน้ำ มาผสมแล้วให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นให้เทวัฏภาคน้ำลงไปผสมกับวัฏภาคน้ำมันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ จนอุณหภูมิเย็นลง ส่วนสารละลายในอาซิनाไมด์ (ละลายในอาซิनाไมด์ 1 กรัมในน้ำ 1.5 มิลลิลิตร) ให้ใส่ลงไปขณะที่ครีมที่กำลังผสมอยู่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเสร็จแล้วบรรจุครีมใส่กระปุกพลาสติกที่ปิดสนิท

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบที่ใช้ในสูตรตำรับ

| Components (g) | Gel | Vanishing cream | Hydrophilic emulsion | Cold cream |
|--------------------|-----------|--------------------|-------------------------|------------|
| <u>Oil phase</u> | | | | |
| Cetyl alcohol | - | - | 5 | - |
| White beeswax | - | 1 | 2 | 12 |
| Mineral oil | - | 5 | - | 56 |
| Stearic acid | - | 10 | 5 | 12.5 |
| Almond oil | - | - | 5 | - |
| <u>Water phase</u> | | | | |
| PG | 2 | - | 5 | - |
| Glycerin | 5 | 5 | - | - |
| TEA | qs | - | 1.8 | - |
| Sodium borate | - | 2 | - | 0.5 |
| Methylparaben | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Propylparaben | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| Citric acid | 0.05 | - | - | - |
| Carbomer 940 | 0.4 | - | - | - |
| Caffeine | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Niacinamide | 4 | 4 | 4 | 4 |
| DI water | qs to 100 | qs to 100 | qs to 100 | qs to 100 |

2. การประเมินคุณภาพของตำรับ

1) ลักษณะภายนอก

การสังเกตลักษณะภายนอก โดยสังเกตเนื้อของตำรับ ความเรียบเนียน สี กลิ่น การแยกชั้นของครีมเบส

2) ความหนืด

การวัดความหนืดของตำรับทำโดยเครื่องมือวัดความหนืดที่เรียกว่า บรูคฟิลด์วิสโคมิเตอร์ (Brookfield viscometer) โดยเริ่มจากการนำตำรับปริมาณ 100 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำบีกเกอร์ไปวางใต้เครื่องวัดความหนืด ใส่หัววัดที่แกนมอเตอร์ (เลือกใช้ T-bar type spindle no. S94) จากนั้นตั้งความเร็วรอบในการหมุนที่ 1 รอบต่อนาที (rpm) การตั้งความเร็วรอบในการหมุน จะตั้งให้ค่าทอร์ค (torque) เข้าใกล้ 100 มากที่สุด และทำการวัดความหนืด

3) ความเป็นกรดต่าง (pH)

การวัด pH เป็นสิ่งสำคัญ เพราะตำรับที่ pH มีการเปลี่ยนแปลง อาจเกิดจากการสลายตัวของสารในตำรับ การวัด pH ของตำรับทำโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า พีเอชมิเตอร์ (pH meter) โดยเริ่มจากการสอบเทียบเครื่องพีเอชมิเตอร์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน (standard buffer solution) pH 7.0-10.0 จากนั้นชั่งแต่ละตำรับมาปริมาณ 5 กรัม แล้ววัดโดยตรงด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

3. การศึกษาความคงตัว

การศึกษาความคงตัวของตำรับ จะศึกษาโดยการเก็บตำรับไว้ในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

- 1) เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 6 เดือน
- 2) เก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เป็นระยะเวลา 6 เดือน
- 3) เก็บที่อุณหภูมิห้องในขณะนั้น (ambient temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน
- 4) เก็บในที่ร้อนสลับเย็น คือเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 รอบ (cycles)

ความคงตัวทางกายภาพ สังเกตจากลักษณะภายนอก คือ สี กลิ่น เนื้อเรียบเนียน การแยกชั้น ความชุ่ม-ใส การเกิดตะกอนของตัวยาสสำคัญ การหดตัว (syneresis) ของเจล คือ การที่ของเหลวที่แทรกอยู่แยกตัวออกมา การกระจายไปบนผิวหนังเมื่อทาที่ผิวหนัง และการวัด pH

การศึกษาความคงตัวทางเคมีทำโดย วิเคราะห์หาปริมาณไนอาซินไมด์และคาเฟอีนที่อยู่ในตำรับวานิชิงครีม ไฮโดรฟิสิกัลมีลชัน และเจล เมื่อครบรอบ 0, 1, 2, 3 และ 6 เดือน ทำโดย ชั่งตำรับมา 1 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปโซนเคตเป็นเวลา 20 นาที

จากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาปริมาณของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนที่อยู่ในตำรับโคลด์ครีม ทำโดย ชั่งตำรับมา 1 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 มิลลิลิตร แล้วนำให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาปริมาณของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน

4. การวิเคราะห์หาปริมาณโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

1) สภาวะการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในตำรับทั้ง 4 ตำรับ ทำด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยดัดแปลงตามวิธีของเภสัชตำรับอเมริกาในหัวข้อการวิเคราะห์หาปริมาณโนอาซิनाไมด์ ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบเดิมที่ระบุในเภสัชตำรับคือ ใช้คอลัมน์ชนิดรีเวอร์สเฟส ซี-18 (reversed phase C-18) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร และยาว 30 เซนติเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่าง 0.005 โมลาร์ โซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนตกับเมทานอล ในอัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 2 มิลลิลิตรต่อนาที ดีเทกเตอร์เป็นชนิดไดโอดอะเรย์ (diode array detector) โดยกำหนดค่าความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตรและปริมาณในการฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร (32) ผู้วิจัยได้ดัดแปลงสภาวะในการวิเคราะห์จากสภาวะเดิมเป็นดังนี้ คือ

วัฏภาคคงที่ (stationary phase): คอลัมน์ชนิดรีเวอร์สเฟส ซี-18 (reversed phase C-18) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร และยาว 25 เซนติเมตร

วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase): สารละลายผสมระหว่าง 0.005 โมลาร์ของสารละลายโซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนตกับเมทานอล ในอัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตร โดยใช้อัตราส่วนคงที่ตลอดการวิเคราะห์ ควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด: ไดโอดอะเรย์ โดยมีการกำหนดค่าความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตร

ปริมาตรที่ฉีด: 20 ไมโครลิตร

วิธีนี้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว

2) การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์

(ทำเหมือนวิธีการศึกษาความคงตัวของเคมีในหัวข้อ 3.2.3)

5. การศึกษาการปลดปล่อยของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนจากตำรับ

การศึกษาการปลดปล่อยของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนจากตำรับผ่านเยื่อกั้น ทำโดยใช้ อุปกรณ์ศึกษาการปลดปล่อย คือ Franz-type diffusion cells และใช้เมมเบรนชนิดสังเคราะห์ คือ Cellu Sep T1 (MW cutoff เท่ากับ 3500) เป็นเยื่อกั้น พื้นที่หน้าตัดของเมมเบรนคือ 1.50 ตาราง เซนติเมตร และตัวบรรจุสารละลายรองรับโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนที่ปลดปล่อยออกมาจากตำรับ (receptor chamber) มีปริมาตร 14.78 มิลลิลิตร นำเมมเบรนแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่าง 7.4 (pH 7.4 phosphate buffer) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ลงในส่วนบรรจุสารละลายรองรับโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีน ที่ปลดปล่อยออกมาจากตำรับ จากนั้นเติมตัวอย่างจากตำรับปริมาณ 1 กรัม ลงในส่วนบรรจุตำรับ (donor) ปิด chamber ให้แน่นด้วยพาราฟิล์มแล้วใช้กระดาษฟอยล์หุ้มทับอีกชั้นหนึ่ง ควบคุม อุณหภูมิที่ 32 ± 1 องศาเซลเซียสและคนสารละลายที่บรรจุในส่วนรองรับ (receptor phase) อย่าง ต่อเนื่องด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร จากส่วน receptor phase ปลดปล่อยออกมาจากตำรับ ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 และ 24 ชั่วโมง และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กลับเข้าไปทันทีที่ปริมาณเท่ากัน จากนั้นทำการกรองสาร ตัวอย่างผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ โนอาซิโนไมด์และคาเฟอีน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง คำนวณปริมาณสาร ที่ปลดปล่อยโดยเปรียบเทียบปริมาณจากกราฟมาตรฐาน

6. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical method validation)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบ สมรรถนะสูง เลือกวารามิเตอร์ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ความจำเพาะ เจาะจง (specificity) ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) และความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (robustness) โดยเลือกตำรับ เจลและวานิชซึ่งครีมมาใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1) ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

เป็นการแสดงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ ที่จะตรวจแยกแยะเฉพาะสารที่ต้องการ วิเคราะห์เท่านั้นโดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่น ทำโดยชั่งตำรับที่มีโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีน มา 1 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 500 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาด รูพรุน 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง และ ชั่งตำรับที่ไม่มีโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีน (ครีมเบส) เตรียมตัวอย่างโดยวิธีเดียวกัน แล้วนำไปฉีด วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จากนั้นนำ chromatogram ที่ได้มา

เปรียบเทียบกับ chromatogram ของสารละลายมาตรฐานโนอาซิनाไมด์และสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน แล้วดูว่ามีพีกรบกวนหรือไม่

2) ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เป็นพารามิเตอร์ที่แสดงถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ ที่ให้ค่าที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด การทดสอบความเป็นเส้นตรงทำโดยการสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นค่าต่าง ๆ กันในช่วงความเข้มข้นที่ทำการวิเคราะห์กับพื้นที่ใต้พีค (peak area) โดยค่าความเป็นเส้นตรงจะรายงานเป็นค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ค่าที่ดีจะมีค่า $> 0.990 - 1.000$

การสร้างกราฟมาตรฐานของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนในน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง แต่ละตัวอย่างทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง สมการเส้นตรงได้จากการสร้างกราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน

3) ความแม่นยำ (Accuracy)

ความแม่นยำเป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งเป็นตัวที่แสดงความใกล้เคียงกันระหว่างผลวิเคราะห์ที่ได้จากการใช้วิธีที่ต้องการทดสอบความถูกต้อง กับค่าที่แท้จริง (true value) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จะรายงานค่าเป็นร้อยละการกลับคืน (% recovery)

การทดสอบความแม่นยำ ทำโดยชั่งตำรับวานิลลาชิ่งครีมมา 1 กรัม ละลายในน้ำ DI จนครบ 500 ml กรองด้วย Millipore รูเปิด 0.45 ไมครอน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (ค่าที่วิเคราะห์ได้ = C_b) จากนั้นแบ่งสารละลายที่เตรียมได้มา 50 ml แล้วนำมาเติมสารละลายโนอาซิनाไมด์และสารละลายคาเฟอีนความเข้มข้น 6 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 0.75 ml (75%) ปริมาตร 1.0 ml (100%) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของ 75% และ 100% ด้วยน้ำ DI จนครบ 51.25 ml และปริมาตร 1.25 ml (125%) จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณร้อยละการกลับคืน ดังนี้ (ตำรับเจลวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับตำรับวานิลลาชิ่งครีม)

$$\% \text{ การกลับคืน} = \frac{C_a - C_b}{C_c} \times 100$$

โดยที่ C_a = ปริมาณในอาซิनाไมด์หรือคาเฟอีน ที่วิเคราะห์ได้ จากตำรับวานิชซึ่งครีมหรือเจลที่เติมสารมาตรฐานในอาซิनाไมด์และคาเฟอีน

C_b = ปริมาณในอาซิनाไมด์หรือคาเฟอีนที่วิเคราะห์ได้จากตำรับ

C_c = ปริมาณสารมาตรฐานในอาซิनाไมด์หรือคาเฟอีน ที่เติมลงไปตำรับ

เกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืนตาม A.O.A.C (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis) อยู่ในช่วงร้อยละ 80.00-110.00 ในแต่ละระดับ

4) ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้บ่งบอกถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หรือความใกล้เคียงของผลการทดสอบที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ กันหลายครั้งโดยใช้ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันภายใต้สภาวะที่กำหนด การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ความเที่ยง 2 หัวข้อ คือ

- ทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกัน (within run precision) ทำโดยนำตำรับวานิชซึ่งครีมและเจลมาเจือจางและฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ในวันเดียวกัน

- ทดสอบความเที่ยงต่างวัน (between run precision) ทำโดยนำตำรับเดียวกันกับการทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกันมาฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ในวันที่ 4 นับถัดจากวันฉีดในวันเดียวกัน

การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ของความเที่ยงในวันเดียวกัน ทำโดยชั่งตำรับวานิชซึ่งครีมและตำรับเจลมา 1 กรัม แล้วนำมาเติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ในวันเดียวกัน และทำการทดสอบความเที่ยงต่างวัน โดยนำตำรับวานิชซึ่งครีมและตำรับเจลตัวอย่างเดียวกับการทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกันมา ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ในวันที่ 4 นับถัดจากวันที่ฉีดในวันเดียวกัน

5) ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness)

ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ เป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ว่ามีผลเหมือนเดิมหรือไม่ ถ้ามีการเปลี่ยนสภาวะการวิเคราะห์ของตัวอย่าง เช่น มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของอัตราส่วนผสมใน mobile phase หรือ มีการเปลี่ยนแปลง pH ใน mobile phase หรือมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของ column หรือมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของ mobile phase เป็นต้น ในการวิจัยครั้งนี้จะทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์โดยการเปลี่ยน flow rate ของ mobile phase ดังนี้ คือ วิเคราะห์ที่ flow rate 0.9 ml/min วิเคราะห์ที่ flow rate 1.0 ml/min วิเคราะห์ที่ flow rate 1.0 ml/min (โดยเปลี่ยนบุคคลที่ฉีดทำการวิเคราะห์) และวิเคราะห์ที่ flow rate 1.1 ml/min โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง แล้วหาค่า %RSD

ผลการทดสอบที่ได้จะแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD, relative standard deviation) และจะต้องมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 2 (33)

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistical analysis)

ใช้สถิติพื้นฐาน คือ ค่าสถิติร้อยละ (percentage) ค่าเฉลี่ย (arithmetic mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)



บทที่ 4 ผลงานวิจัย

4.1 การประเมินคุณภาพของตำรับ

ลักษณะปรากฏทางกายภาพของตำรับเมื่อเตรียมเสร็จ พบว่า ตำรับเจลมีลักษณะใส มีความเรียบเนียน ไม่แยกชั้น ไม่มีกลิ่น ส่วนตำรับครีมทั้ง 3 ตำรับ คือ วานิชชิงครีม ไฮโดรฟิลิกอิมัลชันและโคลด์ครีม ลักษณะที่สังเกตได้จะเหมือนกัน คือ มีสีขาว มีความเรียบเนียน ไม่แยกชั้น ไม่มีกลิ่น เมื่อพิจารณาด้านความหนืด พบว่า ตำรับที่มีความหนืดมากที่สุด เรียงจากมากไปน้อยคือ โคลด์ครีม > ไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน > วานิชชิงครีม > เจล โดยมีค่าความหนืด คือ 8,334, 6,256, 4,823 และ 2,435 cps ตามลำดับ ส่วนค่าพีเอช พบว่า ทั้ง 4 ตำรับมีค่าใกล้เคียงกัน โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ ไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน > วานิชชิงครีม > โคลด์ครีม > เจล โดยมีค่าพีเอชคือ 7.28, 7.09, 6.61 และ 6.50 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ลักษณะปรากฏทางกายภาพของตำรับเมื่อเตรียมเสร็จ

| ตำรับ | สี | ความเรียบเนียน | การแยกชั้น | กลิ่น | ความหนืด (cps) | pH |
|----------------------|-----|----------------|------------|------------|----------------|------|
| Gel | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 2,435 | 6.50 |
| Vanishing cream | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 4,823 | 7.09 |
| Hydrophilic emulsion | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6,256 | 7.28 |
| Cold cream | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 8,334 | 6.61 |

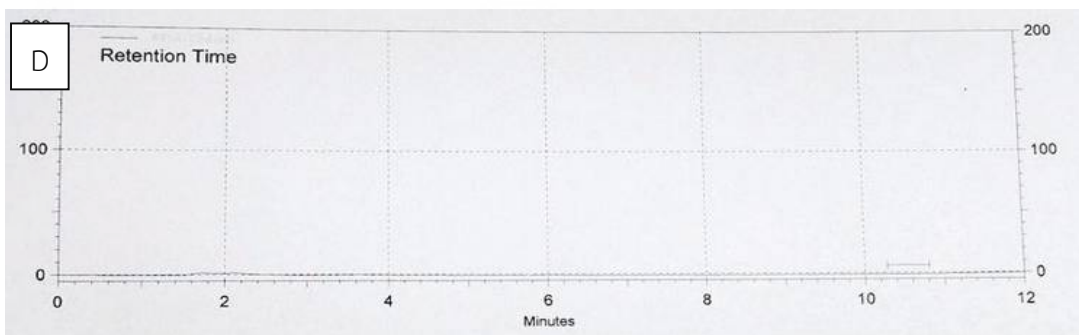
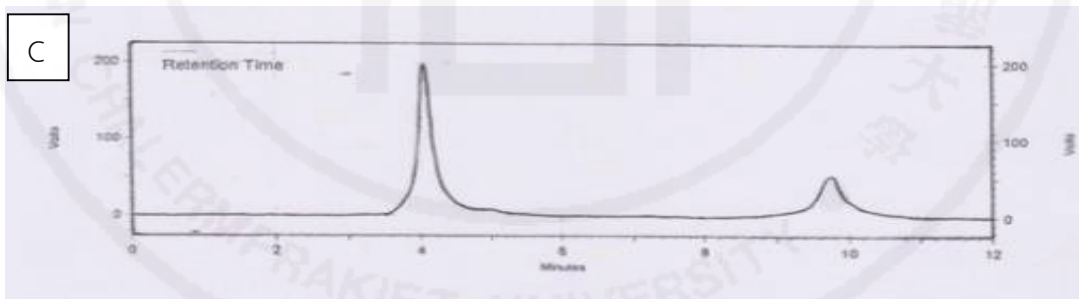
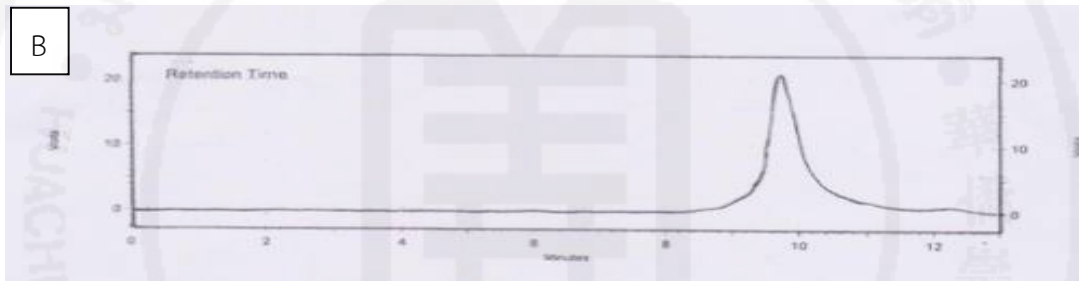
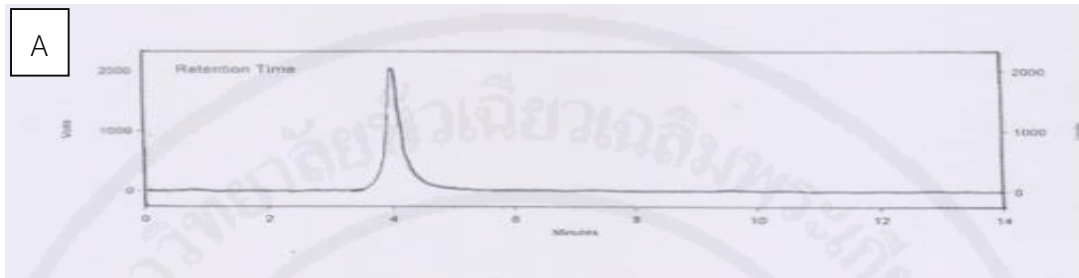
4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1) ความเฉพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

เป็นการแสดงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ ที่จะตรวจแยกแยะสำหรับสารที่ต้องการวิเคราะห์เท่านั้นโดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่น โดยดูจาก chromatogram ของตัวอย่างที่เตรียมโดยเจือจางตำรับวานิชซึ่งครีมและเจลมา 1 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 500 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แล้วฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ไม่พบพีกอื่นรบกวนนอกจากพีกของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีน และพีกของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนมีรีเทนชันไทม์เท่ากับสารละลายมาตรฐานโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีน คือ 4.04 และ 9.78 นาที ตามลำดับ ส่วนการฉีดวิเคราะห์เบสเปล่าด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลคือไม่พบพีกใด ๆ เกิดขึ้น

ภาพที่ 8 Chromatogram ของสารละลายสกัดจากตำรับและสารละลายมาตรฐาน A) สารละลายมาตรฐานไนอาซิनाไมด์ B) สารละลายมาตรฐานคาเฟอีน C) ไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนที่สกัดได้จากตำรับ D) chromatogram จากครีมเบส



2) ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

การสร้างกราฟมาตรฐานของไนอาซิไมด์และกราฟมาตรฐานของคาเฟอีน ทำโดยฉีดสารละลายมาตรฐานไนอาซิไมด์และสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนความเข้มข้น 5, 10, 20, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณพื้นที่ใต้พีคนำมาเขียนกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไนอาซิไมด์และคาเฟอีน และคำนวณสมการเส้นตรงได้ผลดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

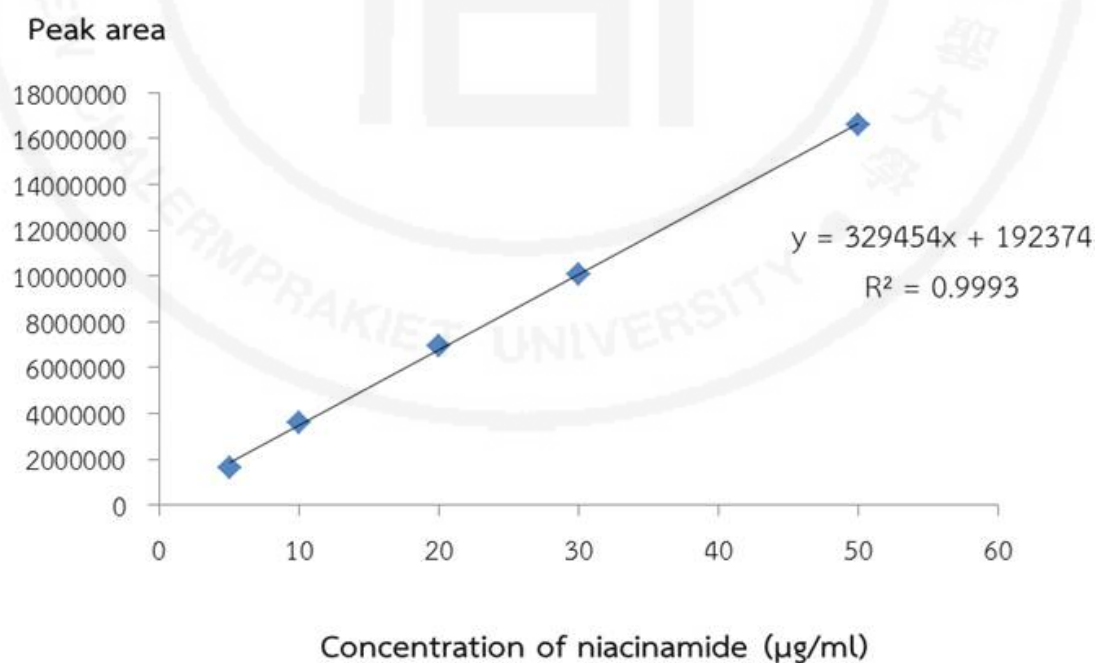
ตารางที่ 3 ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของไนอาซิไมด์ (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

| ลำดับ | ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค (ค่าเฉลี่ย) |
|-------------------------------------|--|--------------------------|------------------------------|
| 1 | 5 | 4.02 | 1631128 |
| 2 | 10 | 4.05 | 3592272 |
| 3 | 20 | 4.00 | 6959865 |
| 4 | 30 | 4.07 | 10066778 |
| 5 | 50 | 4.05 | 16598982 |
| ความชัน (slope) | | 4.04 | 329454 |
| จุดตัดแกน y (y-intercept) | | | 192374 |
| ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) | | | 0.9993 |

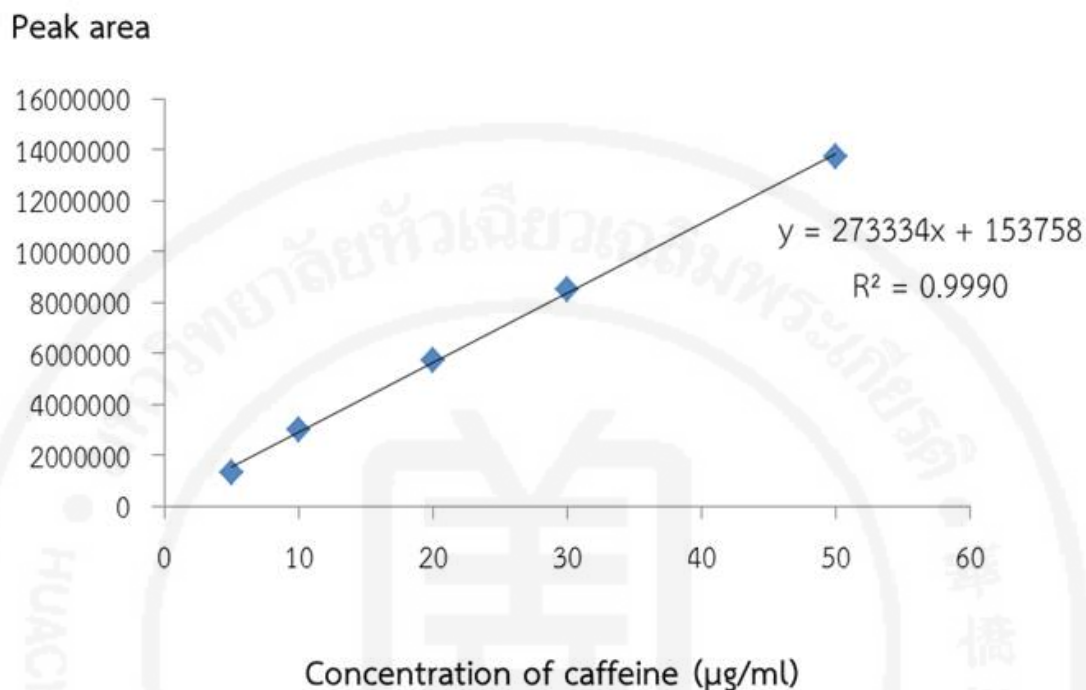
ตารางที่ 4 ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของคาเฟอีน (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

| ลำดับ | ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค (ค่าเฉลี่ย) |
|-------------------------------------|--|--------------------------|------------------------------|
| 1 | 5 | 9.73 | 1312416 |
| 2 | 10 | 9.75 | 2983301 |
| 3 | 20 | 9.78 | 5709207 |
| 4 | 30 | 9.86 | 8496242 |
| 5 | 50 | 9.80 | 13701030 |
| ความชัน (slope) | | 9.78 | 273334 |
| จุดตัดแกน y (y-intercept) | | | 153758 |
| ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) | | | 0.9990 |

แผนภูมิที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไนอาซินาไมด์กับพื้นที่ใต้พีค



แผนภูมิที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนกับพื้นที่ใต้พีค



สมการเชิงเส้นถดถอยของสารละลายมาตรฐานในอาซิनाไมด์เข้มข้น 5-50 µg/ml คือ $y = 329454x + 192374$ และมี $r^2 = 0.9993$ ดังแสดงในภาพ 4.2 ส่วนสมการเชิงเส้นถดถอยของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนที่ความเข้มข้น 5-50 µg/ml คือ $y = 273334x + 153758$ และมี $r^2 = 0.9990$ ดังแสดงในภาพ 4.3 ซึ่งค่า r^2 ของสมการเส้นตรงทั้งสองสารมีค่าไม่น้อยกว่า 0.9990 จึงสามารถนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณสารทั้งสองได้

3) ความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานในอาซิनाไมด์และสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในสารละลายสกัดจากตำรับ 2 ตำรับ คือ ตำรับวานิลลาชิ่งครีมและเจล โดยครอบคลุมช่วงความเข้มข้น 3 ระดับที่ร้อยละ 75.00, 100.00 และ 125.00 ของปริมาณในอาซิनाไมด์และคาเฟอีนในตำรับ

ผลการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานในอาซิनाไมด์ในตำรับวานิลลาชิ่งครีม ที่ระดับร้อยละ 75.00 เท่ากับร้อยละ 98.22 ที่ระดับร้อยละ 100.00 เท่ากับร้อยละ 99.50 และที่ระดับร้อยละ 125.00 เท่ากับร้อยละ 99.73 ดังแสดงในตารางที่ 5 ผลการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนในตำรับวานิลลาชิ่งครีม ที่ระดับร้อยละ 75.00 เท่ากับร้อยละ 93.85 ที่ระดับร้อยละ 100.00 เท่ากับร้อยละ 95.55 และที่ระดับร้อยละ 125.00 เท่ากับร้อยละ 95.96 ดังแสดงในตารางที่ 6

ผลการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานไนอาซิณาไมต์ในตำรับเจล ที่ระดับร้อยละ 75.00 เท่ากับร้อยละ 99.26 ที่ระดับร้อยละ 100.00 เท่ากับร้อยละ 99.17 และที่ระดับร้อยละ 125.00 เท่ากับร้อยละ 98.53 ดังแสดงในตารางที่ 7 ผลการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนในตำรับเจลที่ระดับร้อยละ 75.00 เท่ากับร้อยละ 96.00 ที่ระดับร้อยละ 100.00 เท่ากับร้อยละ 96.78 และที่ระดับร้อยละ 125.00 เท่ากับร้อยละ 94.44 ดังแสดงในตารางที่ 8

จากผลเปอร์เซ็นต์การกลับคืน พบว่า ทุกค่าอยู่ในช่วง 80-110% จึงถือว่าวิธีวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง สามารถนำไปใช้คำนวณปริมาณสารในตำรับได้



ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของโนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิชซึ่งครีม

| ระดับความเข้มข้นของ โนอาซิनाไมด์ (%) | ปริมาณที่เติม (μg) (C_c) | ปริมาณที่ตรวจพบ (μg) (C_a-C_b) | การกลับคืน (%) |
|---|--|--|-------------------|
| 75 | 4.50 | 4.45 | 98.89 |
| | 4.50 | 4.38 | 97.33 |
| | 4.50 | 4.43 | 98.44 |
| | | Average | 98.22 |
| | | %RSD | 0.82 |
| | | | |
| 100 | 6.0 | 6.01 | 100.17 |
| | 6.0 | 5.85 | 97.50 |
| | 6.0 | 6.05 | 100.83 |
| | | Average | 99.50 |
| | | %RSD | 1.77 |
| | | | |
| 125 | 7.50 | 7.40 | 98.67 |
| | 7.50 | 7.48 | 99.73 |
| | 7.50 | 7.56 | 100.80 |
| | | Average | 99.73 |
| | | %RSD | 1.07 |
| | | | |

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานคาเฟอีนในตำรับวานิชซึ่งครีม

| ระดับความเข้มข้นของ คาเฟอีน (%) | ปริมาณที่เติม (μg) (C_c) | ปริมาณที่ตรวจพบ (μg) (C_a-C_b) | การกลับคืน (%) |
|------------------------------------|--|--|-------------------|
| 75 | 4.50 | 4.22 | 93.78 |
| | 4.50 | 4.20 | 93.33 |
| | 4.50 | 4.25 | 94.44 |
| | | Average | 93.85 |
| | | %RSD | 0.59 |
| 100 | 6.0 | 5.78 | 96.33 |
| | 6.0 | 5.70 | 95.0 |
| | 6.0 | 5.72 | 95.33 |
| | | Average | 95.55 |
| | | %RSD | 0.72 |
| 125 | 7.50 | 7.25 | 96.67 |
| | 7.50 | 7.13 | 95.07 |
| | 7.50 | 7.21 | 96.13 |
| | | Average | 95.96 |
| | | %RSD | 0.85 |

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานโนอาซิโนไมด์ในตำรับเจล

| ระดับความเข้มข้น ของโนอาซิโนไมด์ (%) | ปริมาณที่เติม (μg) (C_c) | ปริมาณที่ตรวจพบ (μg) (C_a-C_b) | การกลับคืน (%) |
|---|--|--|-------------------|
| 75 | 4.50 | 4.40 | 97.78 |
| | 4.50 | 4.46 | 99.11 |
| | 4.50 | 4.57 | 100.89 |
| | | Average | 99.26 |
| | | %RSD | 1.57 |
| 100 | 6.0 | 6.03 | 100.5 |
| | 6.0 | 5.89 | 98.17 |
| | 6.0 | 5.93 | 98.83 |
| | | Average | 99.17 |
| | | %RSD | 1.21 |
| 125 | 7.50 | 7.39 | 98.53 |
| | 7.50 | 7.35 | 98.00 |
| | 7.50 | 7.43 | 99.07 |
| | | Average | 98.53 |
| | | %RSD | 0.54 |

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานคาเฟอีนในตำรับเจล

| ระดับความเข้มข้นของ คาเฟอีน (%) | ปริมาณที่เติม (μg) (C_c) | ปริมาณที่ตรวจพบ (μg) (C_a-C_b) | การกลับคืน (%) |
|------------------------------------|--|--|-------------------|
| 75 | 4.50 | 4.35 | 96.67 |
| | 4.50 | 4.24 | 94.22 |
| | 4.50 | 4.37 | 97.11 |
| | | Average | 96.00 |
| | | %RSD | 1.62 |
| 100 | 6.0 | 5.88 | 98.0 |
| | 6.0 | 5.79 | 96.5 |
| | 6.0 | 5.75 | 95.83 |
| | | Average | 96.78 |
| | | %RSD | 1.15 |
| 125 | 7.50 | 7.03 | 93.73 |
| | 7.50 | 7.08 | 94.40 |
| | 7.50 | 7.14 | 95.20 |
| | | Average | 94.44 |
| | | %RSD | 0.78 |

4) ความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ของความเที่ยงในวันเดียวกัน ทำโดยชั่งตำรับวานิชซึ่งครีมและตำรับเจลมา 1 กรัม แล้วนำมาเติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (5-50 $\mu\text{g/ml}$) แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ในวันเดียวกัน และทำการทดสอบความเที่ยงต่างวัน โดยนำตำรับวานิชซึ่งครีมและตำรับเจลตัวอย่างเดียวกับการทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกันมา ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ในวันที่ 4 นับถัดจากวันที่ฉีดในวันเดียวกัน

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันของไนอาซิनाไมด์ ในตำรับวานิชซึ่งครีมในวันเดียวกันเท่ากับ 0.87 และทดสอบความเที่ยงต่างวันเท่ากับ 1.10 ดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10 ตามลำดับ ส่วนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันของคาเฟอีนในตำรับวานิชซึ่งครีมในวันเดียวกันเท่ากับ 0.76 และทดสอบความเที่ยงต่างวันเท่ากับ 1.41 ดังแสดงในตารางที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันของไนอาซิनाไมด์ ในตำรับเจลในวันเดียวกันเท่ากับ 1.90 และทดสอบความเที่ยงต่างวันเท่ากับ 1.84 ดังแสดงในตารางที่ 13 และ 14 ตามลำดับ ส่วนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันของคาเฟอีนในตำรับเจลในวันเดียวกันเท่ากับ 1.01 และทดสอบความเที่ยงต่างวันเท่ากับ 1.04 ดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16 ตามลำดับ

ตารางที่ 9 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์
โนอาซิโนไมด์ในตำรับวานิชชิงคริม ความเข้มข้น 25 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 4.05 | 8504545 |
| 2 | 4.08 | 8416100 |
| 3 | 4.07 | 8483996 |
| 4 | 4.05 | 8544020 |
| 5 | 4.07 | 8587644 |
| 6 | 4.08 | 8394929 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 4.07 | 8488514 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 73736.78 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 0.87 |

ตารางที่ 10 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์
โนอาซิโนไมด์ในตำรับวานิชชิงคริม ความเข้มข้น 25 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 4.08 | 8357240 |
| 2 | 4.08 | 8259760 |
| 3 | 4.05 | 8453563 |
| 4 | 4.03 | 8568785 |
| 5 | 4.05 | 8439373 |
| 6 | 4.07 | 8331176 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 4.06 | 8446650 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 93009 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 1.10 |

ตารางที่ 11 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับวานิลลาซิงครีม ความเข้มข้น 12 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 9.75 | 3454929 |
| 2 | 9.78 | 3510996 |
| 3 | 9.78 | 3463702 |
| 4 | 9.76 | 3502637 |
| 5 | 9.72 | 3491105 |
| 6 | 9.76 | 3448187 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 9.76 | 3478593 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 26422.98 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 0.76 |

ตารางที่ 12 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับวานิลลาซิงครีม ความเข้มข้น 12 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 9.73 | 3412811 |
| 2 | 9.76 | 3457503 |
| 3 | 9.78 | 3398109 |
| 4 | 9.76 | 3500921 |
| 5 | 9.72 | 3415570 |
| 6 | 9.71 | 3409987 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 9.74 | 3432484 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 39167.43 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 1.41 |

ตารางที่ 13 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์
โนอาซิโนไมดีนในตำรับเจล ความเข้มข้น 34 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 4.03 | 11405345 |
| 2 | 4.02 | 11343974 |
| 3 | 4.06 | 11567344 |
| 4 | 4.03 | 10956642 |
| 5 | 4.09 | 11500981 |
| 6 | 4.03 | 11442448 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 4.04 | 11369456 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 216397.4 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 1.90 |

ตารางที่ 14 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์
โนอาซิโนไมดีนในตำรับเจล ความเข้มข้น 34 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 4.05 | 11098660 |
| 2 | 4.04 | 11504596 |
| 3 | 4.08 | 11595563 |
| 4 | 4.03 | 11653240 |
| 5 | 4.04 | 11672239 |
| 6 | 4.03 | 11489127 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 4.05 | 11502238 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 211406.8 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 1.84 |

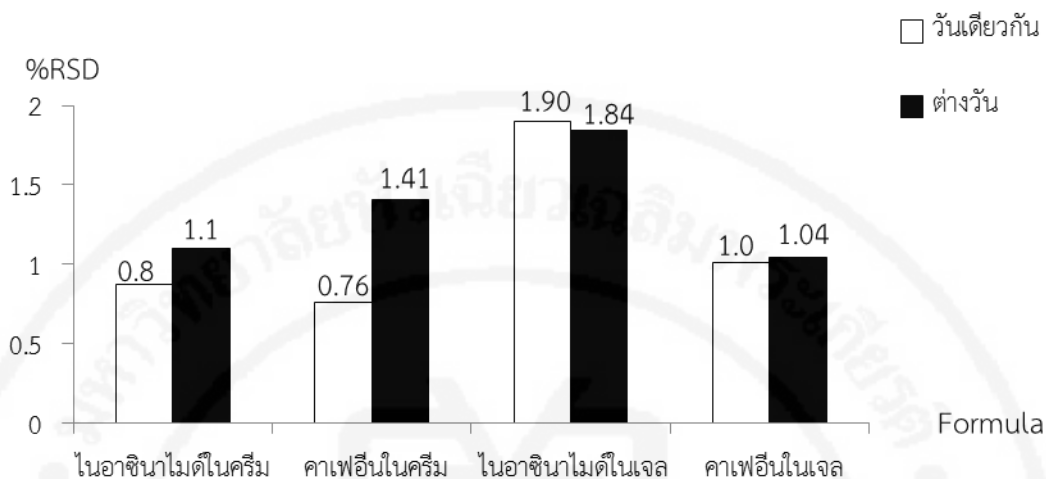
ตารางที่ 15 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงในวันเดียวกันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับเจล ความเข้มข้น 24 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 9.81 | 6749446 |
| 2 | 9.76 | 6645643 |
| 3 | 9.73 | 6754990 |
| 4 | 9.75 | 6689965 |
| 5 | 9.75 | 6807329 |
| 6 | 9.77 | 6825832 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 9.76 | 6745534 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 68464.93 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 1.01 |

ตารางที่ 16 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเที่ยงต่างวันของการวิเคราะห์คาเฟอีนในตำรับเจล ความเข้มข้น 24 µg/ml

| ฉีดครั้งที่ | Retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|--|-----------------------|---------------|
| 1 | 9.78 | 6783391 |
| 2 | 9.73 | 6658327 |
| 3 | 9.73 | 6710093 |
| 4 | 9.75 | 6645944 |
| 5 | 9.78 | 6784439 |
| 6 | 9.77 | 6806729 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 9.76 | 6731487 |
| ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | - | 69695.04 |
| ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | - | 1.04 |

แผนภูมิที่ 6 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์



จากแผนภูมิที่ 6 แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในวันเดียวกันและความเที่ยงต่างวันของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนในตำรับวานิชซึ่งครีมและเจล มีค่าไม่เกิน 2% แสดงว่าวิธีที่เลือกใช้ และเครื่องมือมีความเที่ยงในการวิเคราะห์หาปริมาณของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนในตำรับ

5) ความคงทน (Robustness) ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยซึ่งตำรับวานิชซึ่งครีมและตำรับเจลมา 1 กรัม แล้วนำมาเติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 μ l ทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยน flow rate ของ mobile phase ดังนี้ คือ วิเคราะห์ที่ flow rate 0.9 ml/min วิเคราะห์ที่ flow rate 1.0 ml/min วิเคราะห์ที่ flow rate 1.0 ml/min (โดยเปลี่ยนบุคคลที่ฉีดทำการวิเคราะห์) และวิเคราะห์ที่ flow rate 1.1 ml/min จากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง แล้วหาค่า %RSD

จากการทดลองพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของโนอาซิโนไมด์ ในตำรับวานิชซึ่งครีม วิเคราะห์ที่ flow rate 0.9, 1.0, 1.1 ml/min มีค่าเท่ากับ 0.64, 1.76 และ 1.43 ตามลำดับ และที่ flow rate 1.0 ml/min ที่ฉีดวิเคราะห์โดยบุคคลอื่น มีค่า %RSD เท่ากับ 1.84 ดังแสดงในตารางที่ 17

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของคาเฟอีน ในตำรับวานิลลาชิ่งครีม วิเคราะห์ที่ flow rate 0.9, 1.0, 1.1 ml/min มีค่าเท่ากับ 1.86, 1.98 และ 1.97 ตามลำดับ และที่ flow rate 1.0 ml/min ที่ฉีดวิเคราะห์โดยบุคคลอื่น มีค่า %RSD เท่ากับ 1.60 ดังแสดงในตารางที่ 18

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของโนอาซิनाไมด์ ในตำรับเจลวิเคราะห์ที่ flow rate 0.9, 1.0, 1.1 ml/min มีค่าเท่ากับ 1.16, 1.82 และ 1.38 ตามลำดับ และที่ flow rate 1.0 ml/min ที่ฉีดวิเคราะห์โดยบุคคลอื่น มีค่า %RSD เท่ากับ 1.31 ดังแสดงในตารางที่ 19

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของคาเฟอีน ในตำรับเจลวิเคราะห์ที่ flow rate 0.9, 1.0, 1.1 ml/min มีค่าเท่ากับ 1.73, 1.73 และ 1.32 ตามลำดับ และที่ flow rate 1.0 ml/min ที่ฉีดวิเคราะห์โดยบุคคลอื่น มีค่า %RSD เท่ากับ 1.34 ดังแสดงในตารางที่ 20

โดยจะพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความคงทนของการวิเคราะห์โนอาซิनाไมด์ และคาเฟอีนในตำรับวานิลลาชิ่งครีมและเจลมีค่าไม่เกิน 2% ทุกค่า วิธีวิเคราะห์จึงมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลง flow rate ที่มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากกว่า ± 0.1 ml/min ดังแสดงในแผนภูมิที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 17 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของโนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิลลาชิ่งครีม ความเข้มข้น 22 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อฉีดที่ flow rate ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด

| ฉีด ครั้งที่ | พื้นที่ใต้พีค (ความเข้มข้นของโนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิลลาชิ่งครีม) | | | |
|-----------------|--|-------------------------|---|-------------------------|
| | Flow rate 0.9 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min (เปลี่ยนบุคคล) | Flow rate 1.1 ml/min |
| 1 | 7631966 | 7400596 | 7485807 | 7439825 |
| 2 | 7565540 | 7274444 | 7653338 | 7268897 |
| 3 | 7642890 | 7315114 | 7620012 | 7355527 |
| 4 | 7712105 | 7533216 | 7599073 | 7220004 |
| 5 | 7604504 | 7147415 | 7438168 | 7468005 |
| 6 | 7650173 | 7343528 | 7288930 | 7244667 |
| mean | 7634503 | 7335719 | 7514221 | 7332825 |
| SD | 48990.26 | 128773.2 | 137907.6 | 104719.6 |
| %RSD | 0.64 | 1.76 | 1.84 | 1.43 |

ตารางที่ 18 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของคาเฟอีนในตำรับวานิชซึ่งครีม ความเข้มข้น 10 µg/ml เมื่อฉีดที่ flow rate ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด

| ฉีด ครั้งที่ | พื้นที่ใต้พีค (ความเข้มข้นของคาเฟอีนในตำรับวานิชซึ่งครีม) | | | |
|-----------------|---|-------------------------|---|-------------------------|
| | Flow rate 0.9 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min (เปลี่ยนบุคคล) | Flow rate 1.1 ml/min |
| 1 | 3055085 | 3008596 | 3050584 | 2902260 |
| 2 | 2983443 | 2987538 | 3094755 | 2885977 |
| 3 | 3025496 | 2895376 | 2987925 | 2952658 |
| 4 | 2956643 | 2876283 | 3020863 | 2967767 |
| 5 | 2896632 | 2894708 | 3014470 | 2895033 |
| 6 | 2998665 | 2882301 | 2955930 | 2806488 |
| mean | 2985994 | 2924134 | 3020755 | 2901697 |
| SD | 55404.12 | 58114.59 | 48343.3 | 57129.44 |
| %RSD | 1.86 | 1.98 | 1.60 | 1.97 |

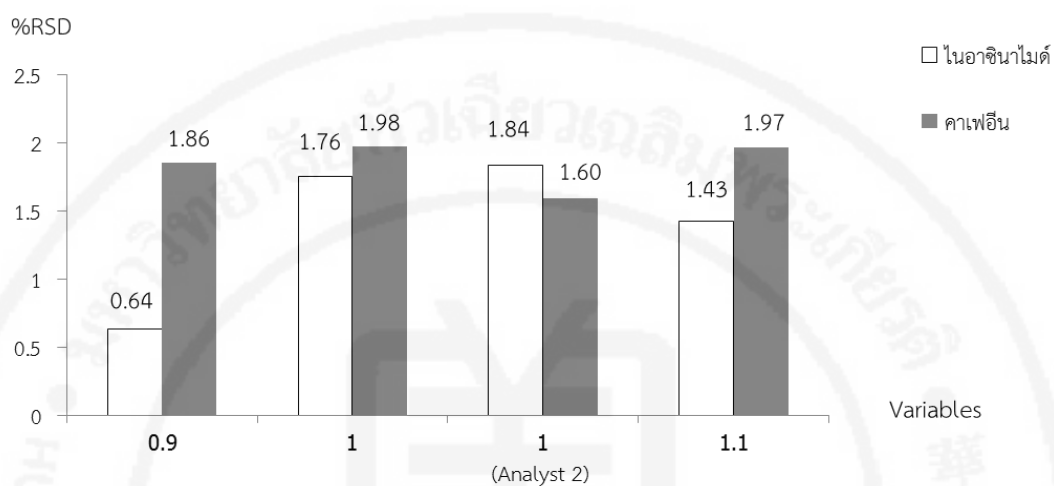
ตารางที่ 19 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของโนอาซิโนไมด์ในตำรับเจล ความเข้มข้น 24 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อฉีดที่ flow rate ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด

| ฉีด ครั้งที่ | พื้นที่ใต้พีค (ความเข้มข้นของโนอาซิโนไมด์ในตำรับเจล) | | | |
|-----------------|--|-------------------------|---|-------------------------|
| | Flow rate 0.9 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min (เปลี่ยนบุคคล) | Flow rate 1.1 ml/min |
| 1 | 8093493 | 8357002 | 8156425 | 8206297 |
| 2 | 7948990 | 8011493 | 8102862 | 8197511 |
| 3 | 7988552 | 7936502 | 8207598 | 8004432 |
| 4 | 7964569 | 8172608 | 8359739 | 8338134 |
| 5 | 7839575 | 8196518 | 8262535 | 8212294 |
| 6 | 7859323 | 8138356 | 8070698 | 8281517 |
| mean | 7949084 | 8135413 | 8193310 | 8206698 |
| SD | 92412.92 | 147749.4 | 107023.3 | 113049.3 |
| %RSD | 1.16 | 1.82 | 1.31 | 1.38 |

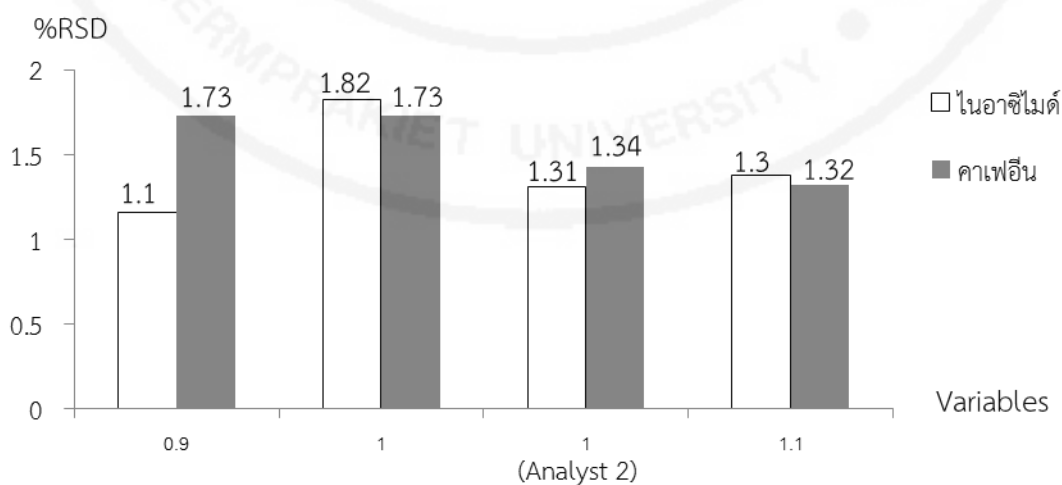
ตารางที่ 20 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของคาเฟอีนในตำรับเจล ความเข้มข้น 11 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อฉีดที่ flow rate ของ ค่าต่าง ๆ และเปลี่ยนบุคคลฉีด

| ฉีดครั้งที่ | พื้นที่ใต้พีค (ความเข้มข้นของคาเฟอีนในตำรับเจล) | | | |
|-------------|---|-------------------------|---|-------------------------|
| | Flow rate 0.9 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min | Flow rate 1.0 ml/min (เปลี่ยนบุคคล) | Flow rate 1.1 ml/min |
| 1 | 3230265 | 3269221 | 3332060 | 3394815 |
| 2 | 3123166 | 3301331 | 3244679 | 3303470 |
| 3 | 3227792 | 3217193 | 3266329 | 3276676 |
| 4 | 3195469 | 3262167 | 3225030 | 3288198 |
| 5 | 3097253 | 3145172 | 3327700 | 3294738 |
| 6 | 3178847 | 3277453 | 3264144 | 3335933 |
| ค่าเฉลี่ย | 3175465 | 3245423 | 3276657 | 3315638 |
| SD | 54781.48 | 56294.81 | 43877.24 | 43673.21 |
| %RSD | 1.73 | 1.73 | 1.34 | 1.32 |

แผนภูมิที่ 7 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความคงทนของวิธีวิเคราะห์ในอาซิनाไมด์ และคาเฟอีนในตำรับวานิลลาซิงครีม ที่ flow rate ต่าง ๆ กัน และทำโดยนักวิเคราะห์บุคคลอื่น



แผนภูมิที่ 8 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความคงทนของวิธีวิเคราะห์ในอาซิनाไมด์ และคาเฟอีนในตำรับเจล ที่ flow rate ต่าง ๆ กัน และทำโดยนักวิเคราะห์บุคคลอื่น



4.3 การศึกษาการปลดปล่อยของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับ

นำตำรับทั้ง 4 ตำรับ มาศึกษาการปลดปล่อยของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับผ่านเยื่อกัน โดยใช้เมมเบรนสังเคราะห์เป็นเยื่อกัน ศึกษาโดยใช้อุปกรณ์ศึกษาการปลดปล่อย Franz-type diffusion cells ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และได้ทำการเก็บตัวอย่างในส่วนบรรจุสารละลายรองรับตัวยา ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนที่ปลดปล่อย คำนวณเป็นปริมาณสะสมของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน แล้วเปรียบเทียบการปลดปล่อยของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนในแต่ละตำรับ

การปลดปล่อยตัวยาทั้งสองชนิดผ่านตำรับครีม จะต้องผ่านการ partition ระหว่างชั้นน้ำมันและชั้นน้ำ ความยากง่ายของการแบ่งภาคผ่านครีมแต่ละชนิด จึงเป็นปัจจัยที่จะส่งผลต่อการปลดปล่อยสารออกจากตำรับ ในการศึกษาให้สารผ่านเมมเบรนชนิด Cellu Sep T₁ แยกอธิบายจลนศาสตร์การปลดปล่อยของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน ดังต่อไปนี้

โนอาซิनाไมด์ เป็นเอสเทอร์พอร์มของโนอาซิน มีค่าการละลายน้ำได้ดีมาก เมื่อละลายน้ำมี pH ระหว่าง 6-7.5 มีค่าการละลายในน้ำ 70 g/100 ml ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และกลีเซอรอล เป็นสารที่มีความคงตัวสูง ทนต่อออกซิเจน และแสง ทั้งในสภาพที่เป็นของแข็งและสารละลาย ในตำรับต่าง ๆ ได้ใส่ในความเข้มข้น 4% w/w ในรูปแบบของสารที่ละลายแล้ว เมื่อทำการศึกษาการปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์ จะมีการแพร่ผ่านเบสของตำรับได้ง่ายและยากตามลักษณะของเบส ได้แก่ เจล จัดเป็น one phase system ที่โมเลกุลของสารแพร่ผ่านได้ดี ดังนั้นจากการศึกษาการปลดปล่อย จะพบว่าม็อดตราเร็วและ flux ในการปลดปล่อยได้มากกว่าตำรับที่เป็นอิมัลชันครีม ซึ่งเป็น two phase system ซึ่งสารต้อง partition ผ่านชั้นน้ำมันและน้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการแพร่ของโมเลกุลสารจึงส่งผลต่อการปลดปล่อยยาจากตำรับ

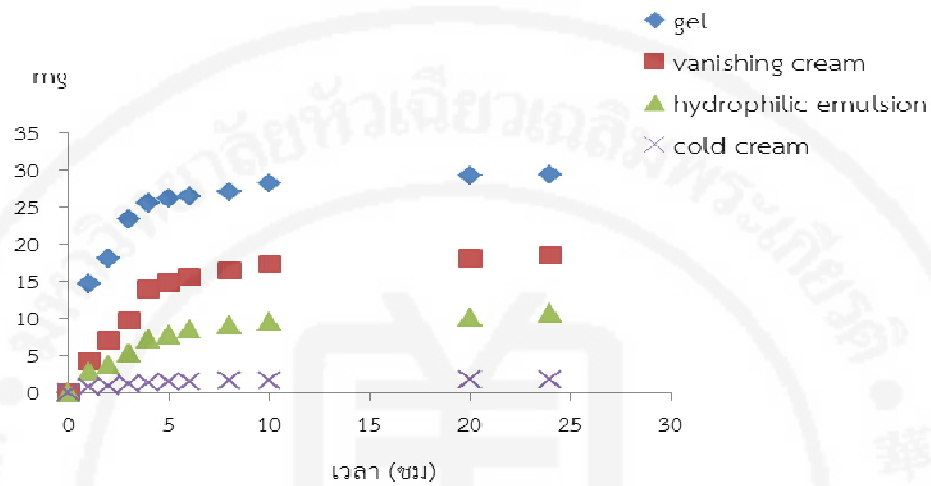
จากแผนภูมิที่ 9 และ 10 แสดงการปลดปล่อยสะสมของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนตามลำดับ พบว่าสารทั้งสองชนิดปลดปล่อยได้ดีจากตำรับเจล การปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์มีแนวโน้มเช่นเดียวกับคาเฟอีน แต่มีการปลดปล่อยในอัตราเร็วและปริมาณที่มากกว่า เนื่องจากมีความเข้มข้นมากกว่า โดยมีความเร็วในการปลดปล่อยสารเรียงจากมากไปน้อย คือ เจล > วานิชิงครีม > ไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน > โคลด์ครีม และมีปริมาณการปลดปล่อยสะสมคิดเป็นร้อยละ 73.35, 46.25, 46.25 และ 26.86% ตามลำดับ ดังนั้นตำรับโคลด์ครีมจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ เนื่องจากอัตราการปลดปล่อยช้าเกินไปและปริมาณที่ปลดปล่อยอาจไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์

จากแผนภูมิที่ 10 แสดงการปลดปล่อยสะสมของคาเฟอีนจากตำรับ 1 กรัม ใน 24 ชม. พบว่า ที่เวลา 0-4 ชม. การปลดปล่อยยาแต่ละตำรับมีอัตราเร็วในการปลดปล่อยแตกต่างกันอย่างชัดเจน ขึ้นกับชนิดของเบสที่ใช้ ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับความหนืดของตำรับ ที่เป็นอุปสรรคต่อการแพร่ของคาเฟอีนออกจากตำรับ โดยมีความเร็วในการปลดปล่อยตัวยาวเรียงจากเร็วไปช้าคือ เจล >

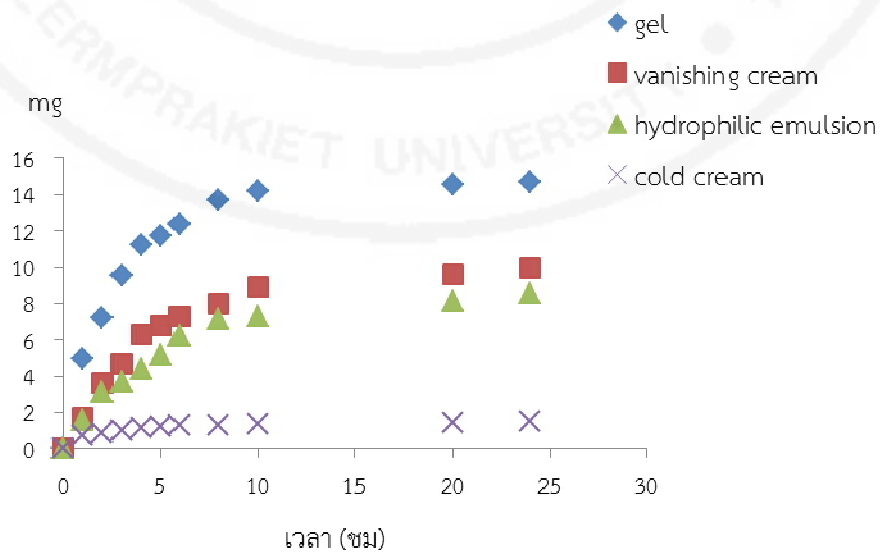
วานิชซึ่งครีม > ไฮโดรฟลิกอิมัลชัน > โคลด์ครีม และมีปริมาณการปลดปล่อยสะสมคิดเป็นร้อยละใกล้เคียงกับการปลดปล่อยของโนอาซิโนไมด์ โดยปลดปล่อยสะสมที่ 24 ชม. มีค่าเท่ากับ 73.55, 49.9, 42.9 และ 7.6% ตามลำดับ

คาเฟอีนเป็นสารที่ละลายน้ำได้ไม่ค่อยดี มีค่าการละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ประมาณ 19-20 mg/ml (34) ตัวรีเซพเตอร์เฟสมีปริมาตรประมาณ 15 ml ดังนั้นสภาวะของรีเซพเตอร์เฟสจึงเป็น sink condition แล้ว เนื่องจากปริมาณยาใน donor phase มีเพียง 20 mg/g จะเห็นว่า ตำรับเจล ที่ 24 ชม. ตัวยามีการแพร่ผ่านชั้นเจลและผ่านสู่ receptor phase ได้มากถึง 14.71 mg/15 ml สำหรับครีมทั้งสามชนิดพบว่าตำรับวานิชซึ่งครีม เป็นตำรับที่มีการปลดปล่อยตัวยาได้เร็วที่สุด เมื่อเทียบกับตำรับ ไฮโดรฟลิกอิมัลชันแล้ว มีความแตกต่างด้านความหนืด โดยตำรับวานิชซึ่งครีมมีความหนืดน้อยกว่าตำรับไฮโดรฟลิกอิมัลชันประมาณ 1.3 เท่า และมีสารก่ออิมัลชันชนิดสบู่คนละชนิดกัน และมีปริมาณที่ต่างกันแต่ตำรับไฮโดรฟลิกอิมัลชันมีค่าพีเอชสูงกว่าเล็กน้อย การปลดปล่อยคาเฟอีนมีค่าต่ำกว่าเพียง 7% จึงถือว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนตำรับโคลด์ครีม มีการปลดปล่อยตัวยาน้อยมาก เนื่องจากเป็นอิมัลชันชนิด w/o และมีความหนืดสูงมากถึงประมาณ 8000 cps. ซึ่งจะเก็บกักยาไว้ที่วฏภาคภายใน ทำให้ยาแบ่งภาคออกมาได้น้อย และการแพร่เกิดขึ้นได้ยาก

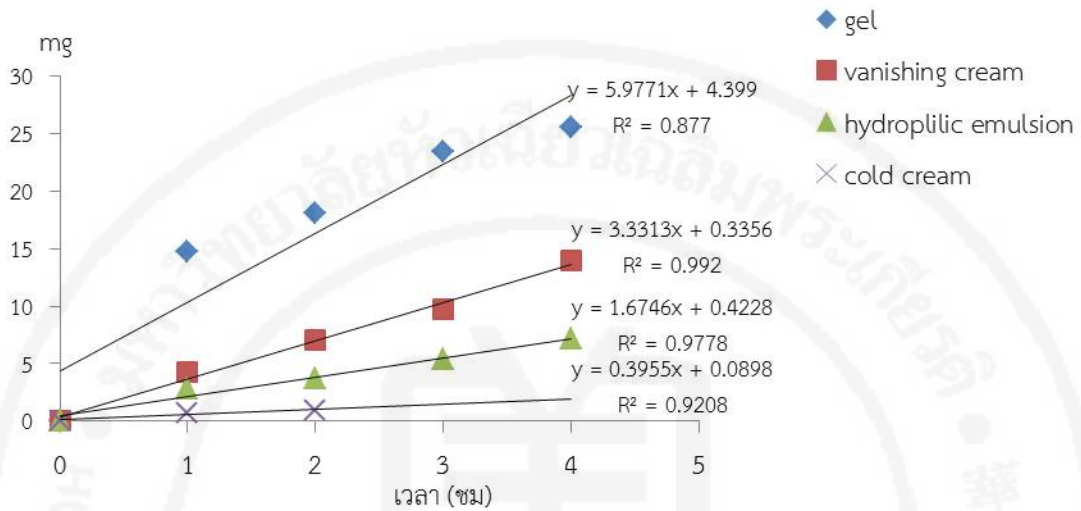
แผนภูมิที่ 9 การปลดปล่อยไนอาซิโนไมด์สะสมจากตำรับต่างๆ ใน 24 ชั่วโมง (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



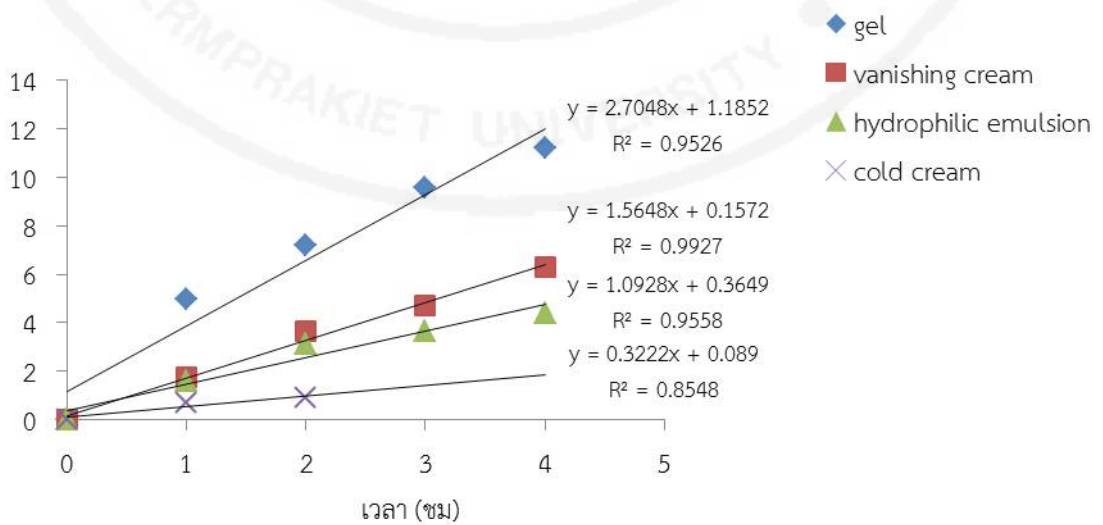
แผนภูมิที่ 10 การปลดปล่อยคาเฟอีนสะสมจากตำรับต่าง ๆ ใน 24 ชั่วโมง (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



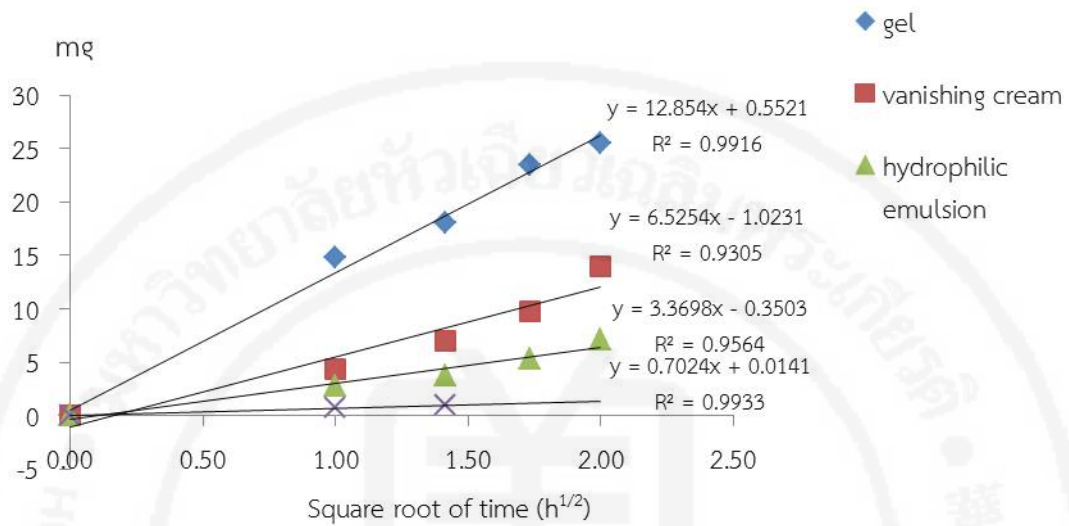
แผนภูมิที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณสะสมของไนอาซิनाไมด์ ที่เวลา 4 ชั่วโมงแรก (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



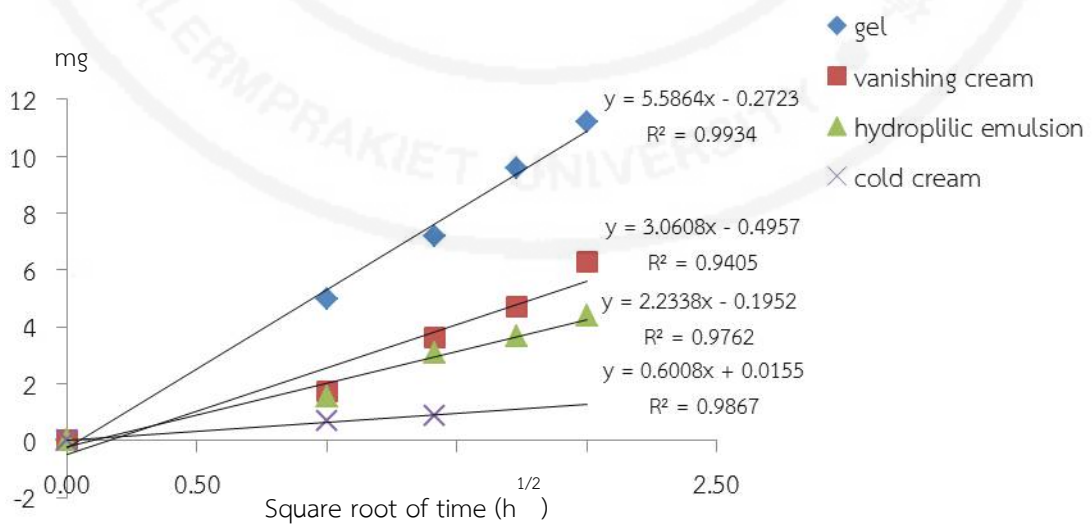
แผนภูมิที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณสะสมของคาเฟอีน ที่เวลา 4 ชั่วโมงแรก (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



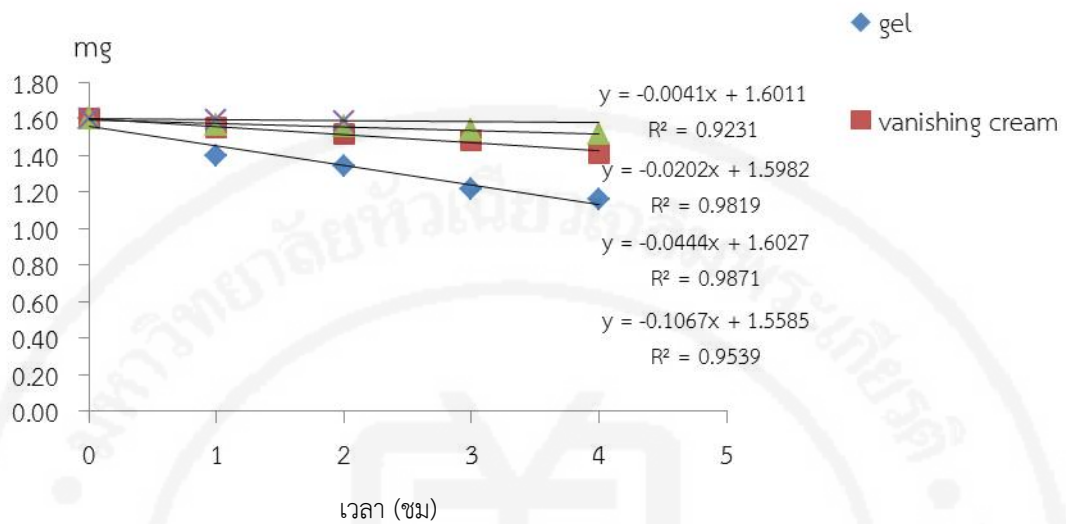
แผนภูมิที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างรากที่สองของเวลา กับปริมาณสะสมของไนอาซิनाไมด์ (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



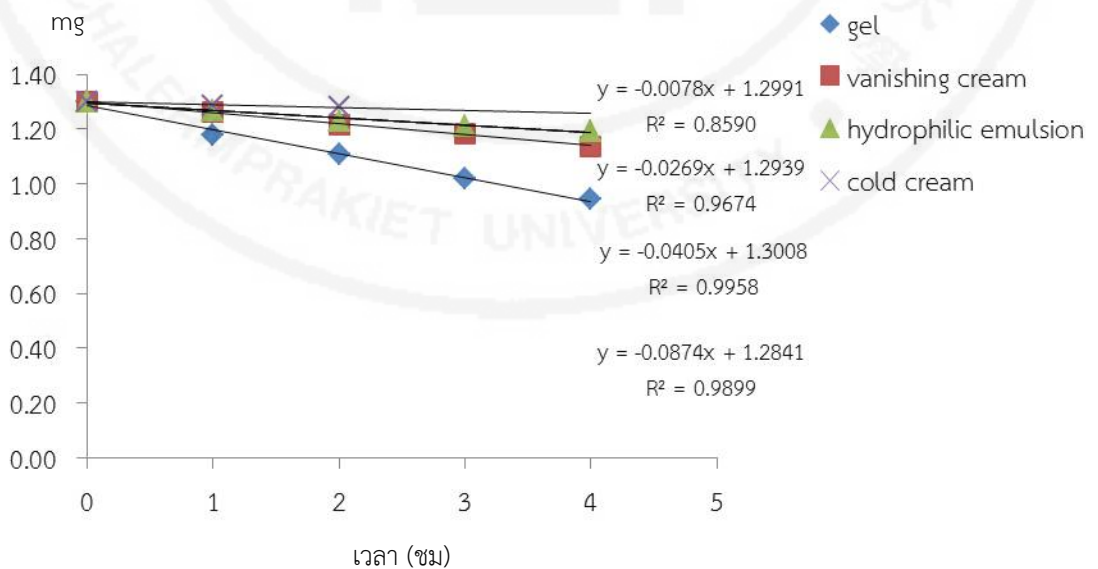
แผนภูมิที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างรากที่สองของเวลา กับปริมาณสะสมของคาเฟอีน (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



แผนภูมิที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับปริมาณของไนอาซิनाไมด์ที่เหลืออยู่ (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



แผนภูมิที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับปริมาณของคาเฟอีนที่เหลืออยู่ (แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง)



ตารางที่ 21 ค่า k และ R² ของไนอาซิโนไมด์จากตำรับต่าง ๆ (ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ)

| Formulations | Zero order | | First order | | Higuchi model | |
|----------------------|------------|----------------|-------------|----------------|---------------|----------------|
| | k | R ² | k | R ² | k | R ² |
| Gel | 5.98 | 0.8770 | 0.107 | 0.9539 | 12.85 | 0.9916 |
| Vanishing cream | 3.33 | 0.9920 | 0.044 | 0.9871 | 6.52 | 0.9305 |
| Hydrophilic emulsion | 1.67 | 0.9778 | 0.020 | 0.9819 | 3.37 | 0.9564 |
| Cold cream | 0.39 | 0.9208 | 0.004 | 0.9231 | 0.67 | 0.9933 |

ตารางที่ 22 ค่า k และ R² ของคาเฟอีนจากตำรับต่าง ๆ (ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ)

| Formulations | Zero order | | First order | | Higuchi model | |
|----------------------|------------|----------------|-------------|----------------|---------------|----------------|
| | k | R ² | k | R ² | k | R ² |
| Gel | 2.70 | 0.9526 | 0.087 | 0.9899 | 5.58 | 0.9934 |
| Vanishing cream | 1.56 | 0.9927 | 0.040 | 0.9958 | 3.06 | 0.9405 |
| Hydrophilic emulsion | 1.09 | 0.9558 | 0.026 | 0.9674 | 2.23 | 0.9762 |
| Cold cream | 0.32 | 0.8548 | 0.007 | 0.8590 | 0.60 | 0.9867 |

จากตารางที่ 21 และ 22 เป็นข้อมูลจลนศาสตร์ที่ได้จากการคำนวณจากผลการปลดปล่อยสะสมที่เวลา 0 - 4 ชั่วโมง โดยใช้สมการโมเดลต่าง ๆ คือ zero order, first order และ Higuchi model พบว่า ปริมาณยาที่ปลดปล่อยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับรากที่สองของเวลามากกว่า แบบ zero order และ first order ส่วนการปลดปล่อยจากตำรับครีม ชนิด o/w ทั้งสองตำรับ มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับเวลา หรือ zero order มากกว่า ซึ่งลักษณะการปลดปล่อยนี้แสดงว่า อัตราการปลดปล่อยค่อนข้างคงที่ใน 4 ชม. แรก หลังจากนั้นจะช้าลง เนื่องจากตัวยาคงต้องแพร่ผ่านระยะทางที่มากขึ้น โดยตำรับวานิชิงครีมและตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชันมีอัตราการปลดปล่อยคาเฟอีนเท่ากับ 1.55 และ 1.09 mg/h ตามลำดับ ขณะที่ตำรับเจลมีอัตราการปลดปล่อย เท่ากับ 2.70 mg/h

ตารางที่ 23 ค่า fluxes ใน 24 ชั่วโมง ของไนอาซินาไมด์และคาเฟอีนจากตำรับชนิดต่าง ๆ

| Formulations | Flux of niacinamide (mcg/cm ² .h) | Flux of caffeine (mcg/cm ² .h) |
|----------------------|---|--|
| Gel | 554±2.1 | 275.8±0.85 |
| Vanishing cream | 377.1±1.0 | 175.0±3.1 |
| Hydrophilic emulsion | 196.14±2.6 | 137.8±1.3 |
| Cold cream | 32.3±0.2 | 25.3±0.2 |

เมื่อพิจารณาค่า flux แสดงถึงปริมาณยาที่ผ่านเยื่อกั้นต่อหน่วยพื้นที่ต่อหน่วยเวลา พบว่าสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการปลดปล่อยยา โดยมีค่า flux ของการปลดปล่อยยา เรียงจากมากไปน้อยตามลำดับคือ เจล > วานิชิงครีม > ไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน > โคลด์ครีม

4.4 การศึกษาความคงตัวของตำรับ

1. การศึกษาความคงตัวทางกายภาพ

ความคงตัวทางกายภาพ เมื่อเก็บตัวอย่างจากตำรับที่เก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) เก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง มาประเมินลักษณะทางกายภาพ เมื่อครบ 6 เดือน ได้ผลดังตารางที่ 24, 25 และ 26 ตามลำดับ

ตารางที่ 24 ผลความคงตัวทางกายภาพของตำรับที่เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) ที่เวลาต่าง ๆ

| ตำรับ | สี | ความเรียบเนียน | การแยกชั้น | กลิ่น | pH |
|----------------------|-----|----------------|------------|------------|------|
| Gel | | | | | |
| 1 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.52 |
| 2 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.63 |
| 3 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.81 |
| 6 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.14 |
| Vanishing cream | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.25 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.31 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.48 |
| 6 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.50 |
| Hydrophilic emulsion | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.39 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.42 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.48 |
| 6 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.53 |
| Cold cream | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.72 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.79 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.81 |
| 6 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.89 |

ตารางที่ 25 ผลความคงตัวทางกายภาพของตำรับที่เก็บในอุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิปกติของห้องในขณะนั้น) ที่เวลาต่าง ๆ

| ตำรับ | สี | ความเรียบเนียน | การแยกชั้น | กลิ่น | pH |
|----------------------|------------|----------------|------------|------------|------|
| Gel | | | | | |
| 1 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.67 |
| 2 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.69 |
| 3 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.73 |
| 6 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.91 |
| Vanishing cream | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.28 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.34 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.66 |
| 6 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.78 |
| Hydrophilic emulsion | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.41 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.46 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.62 |
| 6 เดือน | น้ำตาลอ่อน | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.80 |
| Cold cream | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.74 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.87 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.95 |
| 6 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.07 |

ตารางที่ 26 ผลความคงตัวของทางกายภาพของตำรับที่เก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) ที่เวลาต่าง ๆ

| ตำรับ | สี | ความเรียบเนียน | การแยกชั้น | กลิ่น | pH |
|----------------------|------------|----------------|------------|------------|------|
| Gel | | | | | |
| 1 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.53 |
| 2 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.58 |
| 3 เดือน | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.72 |
| 6 เดือน | ใส | มีฟองอากาศ | มีการหดตัว | ไม่มีกลิ่น | 6.86 |
| Vanishing cream | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.32 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.40 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.49 |
| 6 เดือน | น้ำตาลอ่อน | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.58 |
| Hydrophilic emulsion | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.33 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.37 |
| 3 เดือน | น้ำตาลอ่อน | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.37 |
| 6 เดือน | น้ำตาลเข้ม | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | มีกลิ่น | 7.42 |
| Cold cream | | | | | |
| 1 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.75 |
| 2 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.77 |
| 3 เดือน | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.83 |
| 6 เดือน | น้ำตาลอ่อน | ไม่เรียบเนียน | แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.85 |

จากตารางที่ 24, 25 และ 26 เมื่อเก็บตำรับในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าลักษณะทางกายภาพของตำรับเจลเมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แต่เมื่อเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) พบว่า ตำรับเจลเกิดการหดตัวและมีฟองอากาศ เพราะความร้อนในตู้อบทำให้น้ำเกิดการระเหยออกจากตำรับเจล

ลักษณะทางกายภาพของตำรับวานิชซึ่งครีม เมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แต่จะเกิดการเปลี่ยนสี จากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เพราะที่สภาวะนี้ไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาตำรับ ทำให้ส่วนประกอบในตำรับอาจเกิดการสลายตัว ตำรับจึงเกิดการเปลี่ยนสี

ลักษณะทางกายภาพของตำรับไฮโดรฟลิคอิมีลชั้นเมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องพบว่า ตำรับเกิดการเปลี่ยนสี จากสีขาวเป็นสีน้ำตาลเข้ม และเกิดกลิ่นเมื่อเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) การที่ตำรับไฮโดรฟลิคอิมีลชั้นเกิดการเปลี่ยนสีและเกิดกลิ่นอาจเกิดจากส่วนประกอบในตำรับ คือ almond oil เกิดการสลายตัว เพราะเป็นน้ำมันที่ได้จากธรรมชาติ ทำให้เกิดการสลายตัวได้ง่ายกว่าน้ำมันที่ได้จากการสังเคราะห์

ลักษณะทางกายภาพของตำรับโคลด์ครีม เมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แต่จะเกิดการเปลี่ยนสี จากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อน และเกิดการแยกชั้นเมื่อเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เพราะที่สภาวะที่ร้อนเกินไปอาจทำให้ส่วนประกอบในตำรับเกิดการสลายตัว จึงเกิดการเปลี่ยนสี และเมื่อน้ำระเหยออกจากตำรับทำให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน ทำให้เกิดการแยกชั้นซึ่งแสดงถึงความไม่คงตัวที่เกิดขึ้นของตำรับ ส่วนค่าพีเอชพบว่าในทุกสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ทุกตำรับมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

2. การศึกษาความคงตัวของตัวทางเคมี

การศึกษาความคงตัวของตัวทางเคมี ทำโดยเก็บตัวอย่างจากตำรับที่เก็บอยู่ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) เก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 6 เดือน ได้ผลดังตารางที่ 27, 28 และ 29 ตามลำดับ

ตารางที่ 27 ผลความคงตัวของตัวทางเคมีของตำรับที่เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส)

| ตำรับ | mg/g | | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0 เดือน | 1 เดือน | 2 เดือน | 3 เดือน | 6 เดือน |
| Gel | | | | | |
| Niacinamide | 39.27±1.28 | 38.77±0.37 | 37.82±1.09 | 37.29±0.42 | 36.08±1.33 |
| Caffeine | 18.68±0.80 | 18.51±1.27 | 17.86±0.58 | 17.19±0.93 | 16.74±1.18 |
| Vanishing cream | | | | | |
| Niacinamide | 38.96±0.71 | 38.27±1.11 | 38.00±1.33 | 37.80±0.98 | 36.98±0.69 |
| Caffeine | 19.49±1.64 | 19.00±0.98 | 18.09±0.68 | 17.29±0.65 | 15.84±0.93 |
| Hydrophilic emulsion | | | | | |
| Niacinamide | 39.11±0.08 | 38.08±0.73 | 37.82±0.88 | 37.37±1.42 | 36.21±1.37 |
| Caffeine | 17.98±1.67 | 17.20±0.56 | 16.99±0.90 | 16.55±0.84 | 14.17±0.45 |
| Cold cream | | | | | |
| Niacinamide | 37.18±0.91 | 36.78±0.79 | 36.20±0.89 | 35.97±0.73 | 35.33±0.90 |
| Caffeine | 18.64±0.77 | 18.08±0.89 | 16.84±0.33 | 16.04±0.92 | 15.31±0.66 |

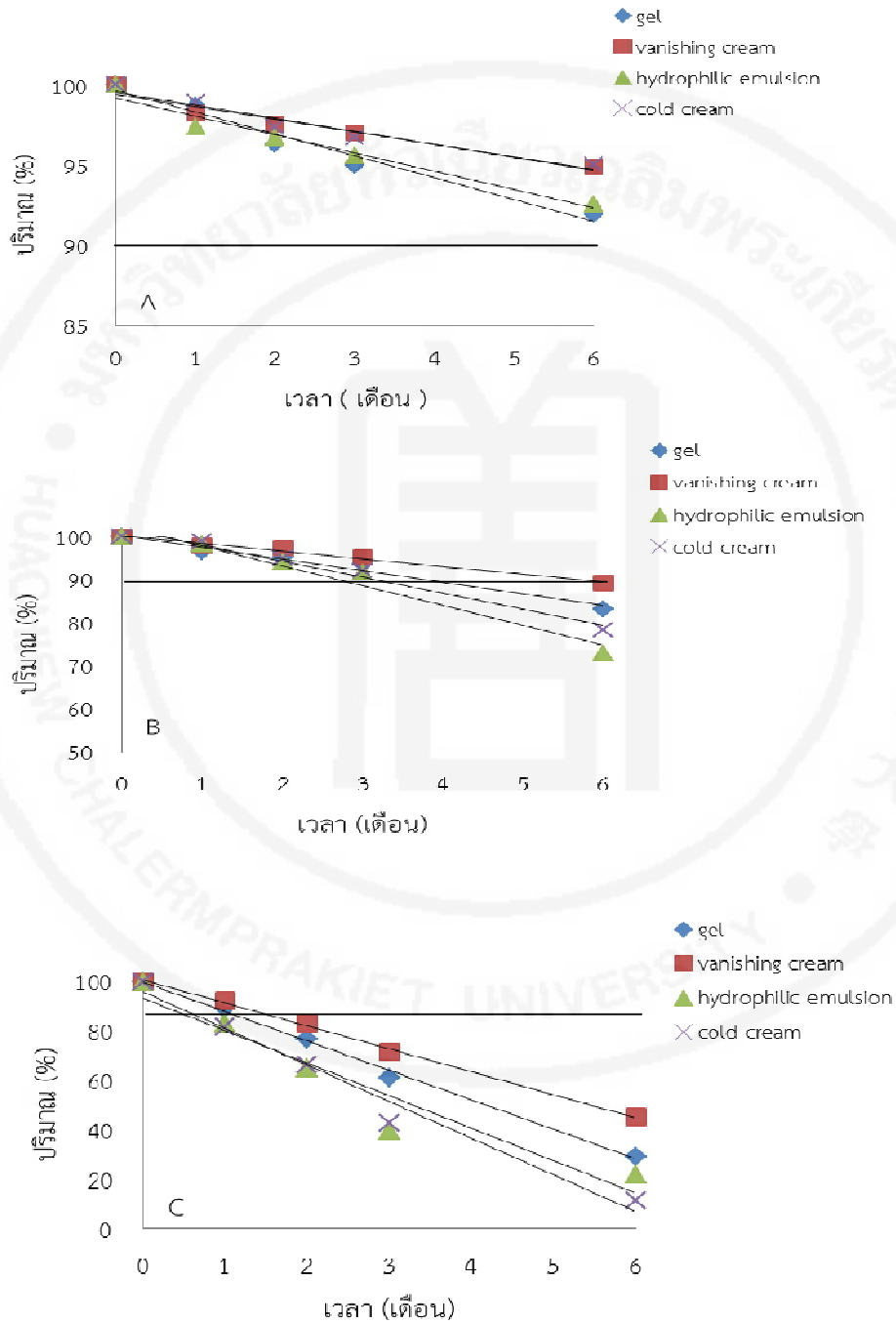
ตารางที่ 28 ผลความคงตัวของตัวยาในอูณหภูมิห้อง

| ตำรับ | mg/g | | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0 เดือน | 1 เดือน | 2 เดือน | 3 เดือน | 6 เดือน |
| Gel | | | | | |
| Niacinamide | 39.27±1.28 | 37.95±0.67 | 37.42±0.78 | 36.82±1.04 | 32.69±1.27 |
| Caffeine | 16.68±0.80 | 17.53±0.82 | 16.91±0.86 | 16.15±0.70 | 13.78±1.63 |
| Vanishing cream | | | | | |
| Niacinamide | 38.96±0.71 | 38.12±0.44 | 37.97±1.47 | 37.14±1.67 | 34.78±0.65 |
| Caffeine | 19.49±1.64 | 18.33±0.94 | 17.74±1.04 | 16.84±1.57 | 14.75±0.85 |
| Hydrophilic emulsion | | | | | |
| Niacinamide | 39.11±0.08 | 38.45±0.89 | 36.85±1.06 | 35.85±1.00 | 28.49±0.86 |
| Caffeine | 17.98±1.67 | 16.99±0.37 | 16.18±1.18 | 15.27±0.56 | 11.50±0.89 |
| Cold cream | | | | | |
| Niacinamide | 37.18±0.91 | 36.77±0.92 | 35.34±0.44 | 34.30±0.88 | 29.16±1.77 |
| Caffeine | 18.64±0.77 | 17.20±0.78 | 16.33±0.55 | 15.64±0.53 | 11.84±0.94 |

ตารางที่ 29 ผลความคงตัวของตัวยาของตำรับที่เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%)

| ตำรับ | mg/g | | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0 เดือน | 1 เดือน | 2 เดือน | 3 เดือน | 6 เดือน |
| Gel | | | | | |
| Niacinamide | 39.27±1.28 | 35.06±0.71 | 30.17±1.06 | 24.11±1.67 | 11.55±1.28 |
| Caffeine | 18.68±0.80 | 16.97±0.92 | 15.96±0.56 | 13.49±1.13 | 6.84±0.23 |
| Vanishing cream | | | | | |
| Niacinamide | 38.96±0.71 | 36.07±1.34 | 32.56±1.54 | 27.98±1.00 | 17.64±1.46 |
| Caffeine | 19.49±1.64 | 17.48±0.98 | 16.50±0.27 | 15.84±0.88 | 9.84±0.33 |
| Hydrophilic emulsion | | | | | |
| Niacinamide | 39.11±0.08 | 32.57±1.59 | 21.53±1.59 | 15.63±0.70 | 8.61±1.10 |
| Caffeine | 17.98±1.67 | 15.53±0.76 | 15.08±0.72 | 14.09±1.16 | 7.31±0.47 |
| Cold cream | | | | | |
| Niacinamide | 37.18±0.91 | 30.36±0.80 | 24.68±0.94 | 15.88±1.18 | 4.27±0.24 |
| Caffeine | 18.64±0.77 | 15.69±0.58 | 14.44±0.57 | 12.37±0.79 | 4.13±0.06 |

แผนภูมิที่ 17 เปรอ์เซ็นต์คงเหลือของโนอาซิโนไมด์ที่เวลาต่าง ๆ A) เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 °C), B) เก็บในอุณหภูมิห้อง, C) เก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75%)



ตารางที่ 30 ค่าคงที่การสลายตัว (ค่า slope) ของไนอาซิनाไมด์ และ $T_{90\%}$ (อายุตำรับ) ที่เก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ

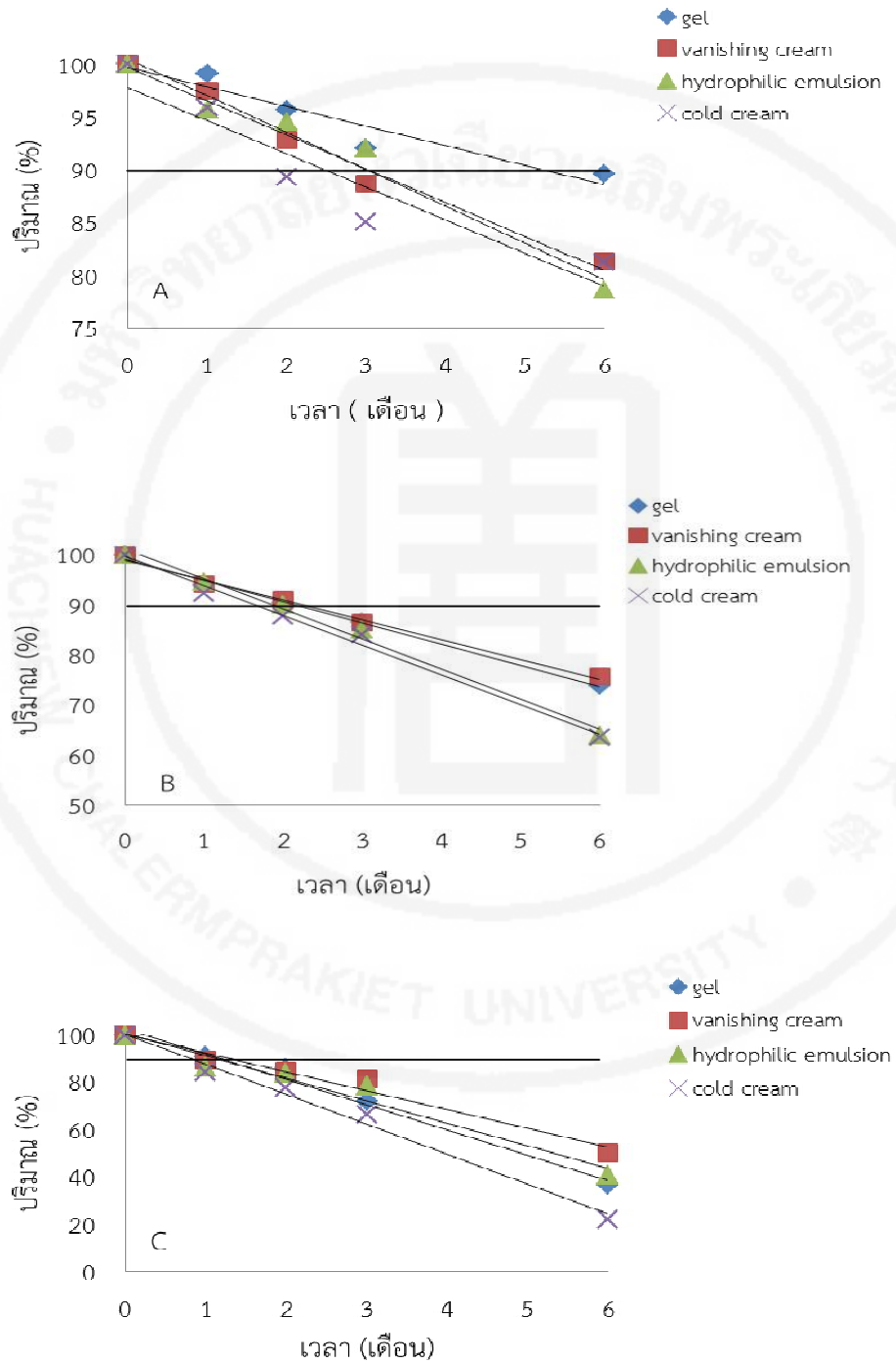
| | Slope (เปอร์เซ็นต์/เดือน) | | | $T_{90\%}$ (เดือน) | | |
|----------------------|---------------------------|--------------|-------|--------------------|--------------|-------|
| | 4-8 °C | อุณหภูมิห้อง | 45 °C | 4-8 °C | อุณหภูมิห้อง | 45 °C |
| Gel | 1.37 | 2.71 | 11.93 | >6 | 5 | ~1 |
| Vanishing cream | 0.78 | 1.76 | 9.29 | >6 | >6 | ~1 |
| Hydrophilic emulsion | 1.15 | 4.62 | 13.17 | >6 | 3 | <1 |
| Cold cream | 0.82 | 3.71 | 14.81 | >6 | 4 | <1 |

ตารางที่ 30 เป็นการนำผลความคงตัวของทุกตำรับมาศึกษาหาค่าคงที่ของการสลายตัวของไนอาซิनाไมด์ โดยพิจารณาจากความชันพบว่า เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 °C ไนอาซิनाไมด์มีค่าคงที่การสลายตัวในตำรับเจล เท่ากับ 1.37 เปอร์เซ็นต์/เดือน รองลงมาคือตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน มีค่าคงที่การสลายตัว เท่ากับ 1.15 เปอร์เซ็นต์/เดือน และตำรับโคลด์ครีมและวานิชซิงครีม มีค่าคงที่การสลายตัวใกล้เคียงกัน คือ 0.82 และ 0.78 เปอร์เซ็นต์/เดือน ตามลำดับ

เมื่อเก็บทุกตำรับในอุณหภูมิห้อง และนำผลความคงตัวของทุกตำรับมาศึกษาหาค่าคงที่ของการสลายตัวของไนอาซิनाไมด์ โดยพิจารณาจากความชันพบว่า ตำรับวานิชซิงครีมมีอายุยามากกว่า 6 เดือน นอกนั้นจะมีค่าต่ำกว่า คืออยู่ในช่วง 3-5 เดือน

เมื่อเก็บทุกตำรับในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) พบว่าตำรับวานิชซิงครีมและเจล สามารถรักษาความคงตัวของไนอาซิनाไมด์ได้มากกว่า 1 เดือน แต่ไม่ถึง 2 เดือน ส่วนตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชันและโคลด์ครีม มีความคงตัวของไนอาซิनाไมด์ได้ประมาณ 1 เดือน และเมื่อนำผลความคงตัวของทุกตำรับมาคำนวณหาค่าคงที่ของการสลายตัวของไนอาซิनाไมด์ โดยพิจารณาจากความชันพบว่า มีค่าคงที่การสลายตัวสูงทุกตำรับ ตั้งแต่ 9.29-14.81 เปอร์เซ็นต์/เดือน

แผนภูมิที่ 18 เปรอ์เซ็นต์คงเหลือของคาเฟอีนที่เวลาต่าง ๆ A) เก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 °C), B) เก็บในอุณหภูมิห้อง, C) เก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75%)



ตารางที่ 31 ค่าคงที่การสลายตัว (ค่า slope) ของคาเฟอีนและ $T_{90\%}$ (อายุตำรับ) ที่เก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ

| | Slope (เปอร์เซ็นต์/เดือน) | | | $T_{90\%}$ (เดือน) | | |
|----------------------|---------------------------|--------------|-------|--------------------|--------------|-------|
| | 4-8 °C | อุณหภูมิห้อง | 45 °C | 4-8 °C | อุณหภูมิห้อง | 45 °C |
| Gel | 1.84 | 4.25 | 10.67 | 5 | 2 | ~1 |
| Vanishing cream | 3.20 | 3.96 | 7.97 | 3 | 2 | ~1 |
| Hydrophilic emulsion | 3.48 | 5.0 | 9.48 | 3 | 2 | ~1 |
| Cold cream | 3.14 | 5.90 | 12.70 | 3 | 2 | <1 |

เมื่อเก็บทุกตำรับในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 °C) พบว่าตำรับเจลมีค่าคงที่การสลายตัว 1.82 เปอร์เซ็นต์/เดือน มีอายุประมาณ 5 เดือน ส่วนตำรับวานิชซิงครีม ไฮโดรฟิลิกอิมัลชันและโคลด์ครีม มีค่าคงที่การสลายสูงกว่า คือ 3.14-3.48 เปอร์เซ็นต์/เดือน ดังแสดงในตารางที่ 31

เมื่อเก็บทุกตำรับในอุณหภูมิห้อง พบว่าทุกตำรับสามารถรักษาความคงตัวของคาเฟอีนได้ประมาณ 2 เดือน ดังแสดงในแผนภูมิที่ 18 (B) และเมื่อพิจารณาค่าคงที่การสลายตัว ตำรับเจลจะมีค่าน้อยที่สุดส่วนตำรับครีมทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน และคาเฟอีนคงตัวดีที่สุดในตำรับวานิชซิงครีม

ส่วนการเก็บตำรับในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) พบว่าตำรับวานิชซิงครีมสามารถรักษาความคงตัวของคาเฟอีนได้มากกว่า 1 เดือน แต่ไม่ถึง 2 เดือน ส่วนตำรับอื่น ๆ มีความคงตัวของคาเฟอีนได้ประมาณ 1 เดือน ดังแสดงในแผนภูมิที่ 18 (C) และเมื่อพิจารณาจากความชันพบว่าตำรับโคลด์ครีมมีการสลายตัวของคาเฟอีนเร็วที่สุด รองลงมาคือ เจล ไฮโดรฟิลิกอิมัลชันและวานิชซิงครีมตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 31

โดยสรุปแล้ว ทั้งในอาซิनाไมด์และคาเฟอีนมีความคงตัวไม่ดีในตำรับต่าง ๆ รวมทั้งตำรับเจล หากเก็บที่ตู้เย็นในอาซิनाไมด์จะมีอายุได้มากกว่า 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องในอาซิनाไมด์จะสลายตัวมากจนทำให้มีอายุประมาณ 3-5 เดือน ส่วนคาเฟอีนมีอายุอยู่ในตู้เย็นได้ประมาณ 3-5 เดือน ที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 °C คาเฟอีนมีอายุประมาณ 1-2 เดือนเท่านั้น

เมื่อพิจารณาความคงตัวของสารทั้งสองในตำรับต่าง ๆ แล้วพบว่า การสลายตัวเกิดขึ้นมากในสารทั้งสองชนิด ทั้งนี้อาจเกิดจากสารเสื่อมสลายเอง โดยสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง และอาจเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ขึ้นระหว่างสารสำคัญด้วยตัวเอง หรือสารสำคัญกับสารอื่นในตำรับ สำหรับในอาซิनाไมด์มีผู้ศึกษาและรายงานไว้ไม่มากกว่าพบการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับพาราเบน ดังรายงานของ Nicoli et. al (35) ที่ศึกษาพบว่าในอาซิनाไมด์จับกับพาราเบนแล้วทำให้ค่าการละลายและค่า permeability ของพาราเบน

เปลี่ยนไป โดยทำให้พาราเบนสามารถละลายได้เพิ่มขึ้น และมีค่า permeability ในไขมันน้อยลง จึงทำให้พาราเบนถูกดูดซึมเข้าผิวหนังได้ลดลง ในตำรับนี้อาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไนอาซิनाไมด์และพาราเบนได้เช่นกัน ซึ่งอาจมีผลต่อค่าการละลายของไนอาซิनाไมด์ในตำรับ ซึ่งต้องศึกษาให้ละเอียดต่อไปว่ามีผลอย่างไรบ้าง สำหรับคาเฟอีนเป็นสารที่มีผู้ศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนไว้ค่อนข้างมาก ว่าคาเฟอีนสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารอื่นแล้วทำให้คุณสมบัติของสารนั้นเปลี่ยนแปลงไป เช่น ค่าการละลาย ค่า partition coefficient มีรายงานว่าคาเฟอีนสามารถเกิด สารประกอบเชิงซ้อนกับสารพวก aromatic molecule ได้เช่นเดียวกับสารในกลุ่ม methylxanthine อื่น ๆ จึงมีโอกาสเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารต่าง ๆ ได้มากมายหลายชนิด เช่น การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างคาเฟอีนกับ MPTP (36), การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างคาเฟอีนกับ gentisic acid (37) และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างคาเฟอีนกับ barbiturate หรือ sulfadiazine (38) เป็นต้น นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานพบว่า คาเฟอีนละลายได้ดีในน้ำมันพืชบางชนิดได้ดีกว่าน้ำ ดังนั้นในตำรับที่มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบมาก ๆ คาเฟอีนอาจ partition ไปอยู่ในชั้นน้ำมัน (39) ได้มาก ทำให้วิเคราะห์ได้ปริมาณน้อยลง เนื่องจากวิธีสกัดสารสำคัญในขั้นตอนการวิเคราะห์ใช้น้ำเท่านั้น อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถระบุได้ชัดว่ามี การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างไรบ้าง

ตารางที่ 32 ความคงตัวของทางกายภาพเมื่อเก็บตำรับในที่ร้อนสลับเย็น (เก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้อบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 รอบ)

| ตำรับ | สี | ความเรียบเนียน | การแยกชั้น | กลิ่น | pH |
|----------------------|------------|----------------|------------|------------|------|
| Gel | ใส | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.53 |
| Vanishing cream | ขาว | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.15 |
| Hydrophilic emulsion | น้ำตาลอ่อน | เรียบเนียน | ไม่แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 7.30 |
| Cold cream | ขาว | เรียบเนียน | แยกชั้น | ไม่มีกลิ่น | 6.65 |

การศึกษาความคงตัวของทางกายภาพเมื่อเก็บทุกตำรับในที่ร้อนสลับเย็น คือเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้อบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 รอบ เมื่อครบ 6 รอบ พบว่า ตำรับที่เกิดการเปลี่ยนสี คือตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน จะเกิดการเปลี่ยนสีจากสีขาวไปเป็นน้ำตาลอ่อน ส่วนการแยกชั้นจะพบว่าเกิดในตำรับโคลด์ครีม ความเรียบเนียนและกลิ่นของทุกตำรับจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และพบว่าค่าพีเอชของทุกตำรับมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 32 การศึกษานี้ทำขึ้นเพื่อดูความทนทานของตำรับ เมื่ออยู่ในสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือถูกเก็บในสภาวะที่อุณหภูมิแปรปรวน พบว่าตำรับที่ควรนำไปพัฒนาในอนาคตคือตำรับเจลและวานิชิ่งครีม เพราะไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและมีความคงตัวมากกว่าตำรับอื่น

ตารางที่ 33 ความคงตัวของครีมเมื่อเก็บตำรับในที่ร้อนสลับเย็น (เก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้อบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 รอบ)

| | ปริมาณสารที่เหลืออยู่ (%) | | | |
|-------------|---------------------------|-----------------|----------------------|------------|
| | gel | vanishing cream | hydrophilic emulsion | cold cream |
| niacinamide | 97.17 | 98.55 | 93.23 | 96.09 |
| caffeine | 97.0 | 98.84 | 95.21 | 93.43 |

การศึกษาความคงตัวของครีมเมื่อเก็บทุกตำรับในที่ร้อนสลับเย็น คือเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้อบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 6 รอบ เมื่อครบ 6 รอบ จึงนำตำรับมาวิเคราะห์หาปริมาณไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน โดยมีวิธีวิเคราะห์ คือ ชั่งตำรับมา 1 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 กรัม (ตำรับโคลด์ครีม เมื่อเติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 กรัม แล้วนำให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 5 นาที) แล้วนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีควิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาปริมาณของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีน ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนที่อยู่ในตำรับ ผลการศึกษาพบว่าตำรับที่มีปริมาณไนอาซิनाไมด์เหลืออยู่มากที่สุดคือ ตำรับวานิชิงครีมรองลงมา คือ เจล โคลด์ครีมและไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน ตามลำดับ ส่วนตำรับที่มีปริมาณคาเฟอีนเหลืออยู่มากที่สุดคือ ตำรับวานิชิงครีมรองลงมา คือ ตำรับเจล ไฮโดรฟิลิกอิมัลชันและโคลด์ครีม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 33

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนจากตำรับทั้งหมด 4 ตำรับ คือ เจลวานิชซิงครีม ไฮโดรฟลิโกอิมัลชันและโคลด์ครีม พบว่าตำรับที่สามารถปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนได้ดีที่สุดคือ ตำรับเจล รองลงมาคือ วานิชซิงครีม ไฮโดรฟลิโกอิมัลชันและโคลด์ครีม ตามลำดับ

การปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์จากตำรับเจลและโคลด์ครีม จะมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตามสมการของ Higuchi การปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์จากตำรับวานิชซิงครีม จะมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตาม zero order และการปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์จากตำรับไฮโดรฟลิโกอิมัลชันสามารถอธิบายได้เป็น zero order ได้ ส่วนความสามารถในการปลดปล่อยโนอาซิनाไมด์ได้ค่า flux และอัตราเร็วสูงสุดในตำรับเจล รองลงมา คือ วานิชซิงครีม ไฮโดรฟลิโกอิมัลชันและโคลด์ครีม ตามลำดับ ซึ่งอัตราและปริมาณในการปลดปล่อยขึ้นกับความหนืดของตำรับ

การปลดปล่อยคาเฟอีนจากตำรับเจลและตำรับโคลด์ครีม จะมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตามสมการของ Higuchi ส่วนการปลดปล่อยคาเฟอีนจากตำรับวานิชซิงครีมจะมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตาม zero order และ first order และการปลดปล่อยคาเฟอีนจากตำรับไฮโดรฟลิโกอิมัลชันเป็นไปตามสมการของ Higuchi ส่วนความสามารถในการปลดปล่อยคาเฟอีนได้ค่า flux และอัตราเร็วสูงสุดในตำรับเจล รองลงมา คือ วานิชซิงครีม ไฮโดรฟลิโกอิมัลชันและโคลด์ครีม ตามลำดับ เช่นเดียวกับโนอาซิनाไมด์

การศึกษาด้านความคงตัวพบว่า ทั้งโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนมีการสลายตัวเมื่ออยู่ในตำรับทุกตำรับ โดยสลายตัวมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น คือเมื่อเก็บในตู้เย็นพบว่ามีความคงตัวมากที่สุดในตำรับเจล โดยมีอายุประมาณ 5-6 เดือน วานิชซิงครีมและไฮโดรฟลิโกอิมัลชันและโคลด์ครีมมีความคงตัวประมาณ 3 เดือน นับจากวันที่ผลิต ส่วนที่เก็บในอุณหภูมิห้องพบว่าทุกตำรับมีความคงตัวลดลง ส่วนที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นสภาพแรงที่สูงเกินไป แต่แสดงให้เห็นว่าตำรับเจลให้การปลดปล่อยดีกว่าและมีความคงตัวมากกว่าตำรับอื่น ๆ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าตำรับนี้น่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นประโยชน์ต่อไป

5.2 อภิปรายผล

1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำ chromatogram ของสารละลายมาตรฐานโนอาซิनाไมด์และสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน มาเปรียบเทียบกับ chromatogram ของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนที่อยู่ในตำรับ พบว่า ค่า retention time ของทั้ง 2 chromatogram ขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกัน และไม่พบว่ามีพีคอื่นรบกวนจากการสร้างกราฟมาตรฐานของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนในช่วงความเข้มข้น 5-50 $\mu\text{g/ml}$ โดยสมการเส้นตรงแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดี คือ เท่ากับ 0.9993 และ 0.9990 ตามลำดับ จากผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในตำรับวานิชซึ่งครีมและเจลพบว่า ผลการกลับคืนของการวิเคราะห์ปริมาณโนอาซิनाไมด์ในตำรับวานิชซึ่งครีมที่ระดับร้อยละ 75.00, 100 และ 125 เท่ากับ 98.22, 99.50 และ 99.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการกลับคืนของการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตำรับวานิชซึ่งครีมที่ระดับร้อยละ 75.00, 100 และ 125 เท่ากับ 93.85, 95.55 และ 95.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการกลับคืนของการวิเคราะห์ปริมาณโนอาซิनाไมด์ในตำรับเจลที่ระดับร้อยละ 75.00, 100 และ 125 เท่ากับ 99.26, 99.17 และ 98.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการกลับคืนของการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตำรับเจล ที่ระดับร้อยละ 75.00, 100 และ 125 เท่ากับ 96.00, 96.78 และ 94.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืนตาม AOAC (2012) อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-110.0 ในแต่ละระดับ จากการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในวันเดียวกันและความเที่ยงต่างวันของโนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนที่อยู่ในตำรับวานิชซึ่งครีมและเจล พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันและความเที่ยงต่างวัน มีค่าไม่เกิน 2% ซึ่งเป็นไปตามค่ากำหนด จากการทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ในตำรับวานิชซึ่งครีมและเจล พบว่า เมื่อเปลี่ยน flow rate หรือเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 2% ซึ่งเป็นไปตามค่ากำหนด ผลของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงความจำเพาะเจาะจง ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีวิเคราะห์ที่ดี แสดงว่าวิธีที่ทำการตรวจสอบมีความถูกต้องและมีความเหมาะสมในการนำมาวิเคราะห์

2. การประเมินคุณภาพของสูตรตำรับ

เมื่อเตรียมตำรับเสร็จใหม่ ๆ ทุกตำรับจะมีลักษณะทางภาพที่เหมือนกัน คือ มีความเรียบเนียน ไม่แยกชั้น และไม่มีการก่อก้อน ตำรับวานิชซึ่งครีม ไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน และโคลด์ครีม จะมีสีขาว ส่วนตำรับเจล จะใสไม่มีสี ตำรับที่มีความหนืดมากที่สุดคือตำรับโคลด์ครีม รองลงมาคือไฮโดรฟิลิกอิมัลชันวานิชซึ่งครีมและเจลตามลำดับ ส่วนค่าพีเอชพบว่า ทุกตำรับมาค่า pH ใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 6.50 – 7.28

3. การศึกษาการปลดปล่อยของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนจากตำรับผ่านเยื่อกั้น

การศึกษาการปลดปล่อยของโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนจากตำรับผ่านเยื่อกั้น โดยใช้ อุปกรณ์ศึกษาการปลดปล่อย คือ Franz-type diffusion cells และใช้เมมเบรนสังเคราะห์ คือ Cellu Sep T1 (MW cutoff เท่ากับ 3500) เป็นเยื่อกั้น เมื่อศึกษาการปลดปล่อยครบ 24 ชั่วโมง พบว่า ตำรับที่สามารถปลดปล่อยโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนได้มากที่สุด คือ ตำรับเจล รองลงมาคือ วานิชชิงคริม ไฮโดรฟิลิกอิมัลชันและโคลด์คริม ตามลำดับ โดยที่การปลดปล่อยทั้งโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนจากตำรับเจลและโคลด์คริมจะมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตามสมการของ Higuchi การปลดปล่อยโนอาซิโนไมด์จากตำรับวานิชชิงคริมจะมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตาม zero order ส่วนการปลดปล่อยคาเฟอีนจากตำรับวานิชชิงคริมจะมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นไปตาม first order และการปลดปล่อยทั้งโนอาซิโนไมด์และคาเฟอีนจากตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชันสามารถอธิบายได้ทั้ง zero order และ first order ส่วนความสามารถในการปลดปล่อยสารทั้งสองชนิดได้ค่า flux และอัตราเร็วสูงที่สุดในตำรับเจลรองลงมา คือ วานิชชิงคริม ไฮโดรฟิลิกอิมัลชันและโคลด์คริม ตามลำดับ

4. การศึกษาความคงตัว

1) ความคงตัวทางกายภาพ

เมื่อเก็บทุกตำรับในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ลักษณะทางกายภาพของตำรับเจลเมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แต่เมื่อเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) พบว่า ตำรับเจลเกิดการหดตัวและมีฟองอากาศ เพราะความร้อนในตู้อบทำให้น้ำเกิดการระเหยออกจากตำรับเจล ตำรับเจลจึงเกิดการหดตัวซึ่งแสดงถึงความไม่คงตัวของตำรับ ส่วนค่าพีเอชของตำรับพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

ลักษณะทางกายภาพของตำรับวานิชชิงคริม เมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แต่จะเกิดการเปลี่ยนสี จากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เพราะที่สภาวะนี้ไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาตำรับ ทำให้ส่วนประกอบในตำรับอาจเกิดการสลายตัว ตำรับจึงเกิดการเปลี่ยนสี ส่วนค่าพีเอชของตำรับพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

ลักษณะทางกายภาพของตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชันเมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องพบว่า ตำรับเกิดการเปลี่ยนสี จากสีขาวเป็นสีน้ำตาลเข้ม และเกิดกลิ่นเมื่อเก็บในตู้อบ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) การที่ตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชันเกิดการเปลี่ยนสีและเกิดกลิ่นอาจเกิดจากส่วนประกอบในตำรับ คือ almond oil เกิดการสลายตัว เพราะเป็นน้ำมันที่ได้จากธรรมชาติทำ

ให้เกิดการสลายตัวได้ง่ายกว่าน้ำมันที่ได้จากการสังเคราะห์ ส่วนค่าพีเอชของตำรับพบว่ามีความเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

ลักษณะทางกายภาพของตำรับโคลด์ครีม เมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แต่จะเกิดการเปลี่ยนสี จากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อน และเกิดการแยกชั้นเมื่อเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เพราะที่สภาวะที่ร้อนเกินไปอาจทำให้ส่วนประกอบในตำรับเกิดการสลายตัว จึงเกิดการเปลี่ยนสี และเมื่อนำระเหยออกจากตำรับทำให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน ทำให้เกิดการแยกชั้นซึ่งแสดงถึงความไม่คงตัวที่เกิดขึ้นของตำรับ ส่วนค่าพีเอชของตำรับพบว่ามีความเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ พบว่า ตำรับวานิชิงครีมและเจลมีการเปลี่ยนทางกายภาพน้อยที่สุด จึงเป็นตำรับที่มีความคงตัวดีที่สุดเมื่อเทียบกับตำรับอื่น ๆ และตำรับไฮโดรฟิสิกัลมีลชันพบว่ามีการเปลี่ยนทางกายภาพมากที่สุด เมื่อเทียบกับตำรับอื่น ๆ จึงเป็นตำรับที่มีความคงตัวต่ำที่สุด

2) ความคงตัวทางเคมี

พบว่าเมื่อเก็บทุกตำรับไว้ในอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 6 เดือน ทั้งไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนมีการสลายตัวเมื่ออยู่ในตำรับทุกตำรับ โดยสลายตัวมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น คือเมื่อเก็บในตู้เย็นพบว่ามีความคงตัวมากที่สุด โดยตำรับเจล วานิชิงครีมและไฮโดรฟิสิกัลมีลชัน มีความคงตัวประมาณ 6 เดือน นับจากวันที่ผลิต ส่วนตำรับโคลด์ครีม มีความคงตัวประมาณ 2 เดือน นับจากวันที่ผลิต เมื่อเก็บในอุณหภูมิห้องพบว่าทุกตำรับมีความคงตัวประมาณ 2 เดือน ส่วนที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นสภาพเร่งที่สูงเกินไป ทุกตำรับมีความคงตัวได้ไม่ถึง 1 เดือน โดยพบว่าตำรับวานิชิงครีมสามารถรักษาปริมาณสารทั้งสองชนิดไว้ได้มากที่สุด การวิเคราะห์หาปริมาณไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนในตำรับเมื่อเก็บความคงตัวทางเคมี พบว่าทั้งปริมาณของไนอาซิनाไมด์และปริมาณคาเฟอีนได้ค่าที่น้อยมาก สาเหตุอาจเกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารสำคัญ มีงานวิจัยรายงานว่าคาเฟอีนสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารพวก aromatic molecule ได้ และไนอาซิनाไมด์มีสูตรโมเลกุลที่มี aromatic molecule อยู่ เพราะฉะนั้นสารสำคัญทั้งสองชนิดมีโอกาที่จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งกันได้ หรืออาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารสำคัญกับสารที่เป็นส่วนประกอบในตำรับ เช่น การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไนอาซิनाไมด์กับพาราเบน หรืออาจเกิดจากความไม่คงตัวของตำรับเนื่องจากเกิดการเสื่อมสลายของสารสำคัญหรือสารอื่น ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของตำรับ และอาจเกิดจากวิธีการสกัดสารสำคัญออกจากตำรับไม่เหมาะสม จึงทำให้สกัดสารสำคัญออกจากตำรับได้ไม่หมด จึงคำนวณได้เปอร์เซ็นต์ต่ำ ส่งผลให้ความคงตัวต่ำด้วย

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. วิธีวิเคราะห์อาจยังมีความไม่เหมาะสม เนื่องจากมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทำเพียงแค่ 2 ตำรับ คือตำรับวานิชซึ่งครีมและเจล เพราะฉะนั้นควรรนำทั้ง 4 ตำรับมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้วิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมที่ดีที่สุดเสียก่อน
2. ควรศึกษาการเตรียมตำรับให้มีความคงตัวสูง โดยศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารสำคัญกับสารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในตำรับ



เอกสารอ้างอิง

1. Parvez S, kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK et al. Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agents. *Phytother Res.* 2006; 20: 921-34.
2. Lloyd HW, Kammer JN. Treatment of Hyperpigmentation. *Semin Cutan Med Surg.* 2011; 30: 171-5.
3. Konda S, Geria AN, Halder RM. New Horizons in Treating Disorders of Hyperpigmentation in Skin of Color. *Semin Cutan Med Surg.* 2012; 31: 133-139.
4. Azulay MM, Bagatin E. Cosmeceuticals vitamins. *Clinics in Dermatology.* 2009; 27: 469-74.
5. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* 2003; 16: 101-10.
6. Herman A, Herman AP. Caffeine's mechanisms of action and cosmetic use. *Skin Pharmacol ol Physiol.* 2013; 26 (1): 8-14
7. American Cancer Society. Skin Cancer: Basal and Squamous Cell [Internet]. 2015 [cited 2015 July 20]. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-basalandsquamouscell/detailedguide/skin-cancer-basal-and-squamous-cell-what-is-basal-and-squamous-cell>.
8. Health, Medicine and Anatomy Reference Pictures. Melanocytes [Internet]. 2013 [cited 2015 July 20]. Available from: <http://healthfavo.com/melanocytes.html>.
9. Lupo MP. Antioxidants and Vitamins in cosmetics. Elsevier Science Inc. 2001.
10. Bissett DL. Common cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology.* 2009; 27: 435-45
11. Perez LE, Moncada B, Cazares JP. A double-blind randomized trial of 5% ascorbic vs. 4% hydroquinone in melisma. *International Journal of Dermatology.* 2004; 43: 604-7.
12. Grimes PE. Management of Hyperpigmentation in Darker Racial Ethnic Groups. *Semin Cutan Med Surg.* 2009; 28: 77-85.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

13. Burdock GA, Soni MG, Carabin IG. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2001; 33: 80-101.
14. Silva MR, Celem LR, Silva SR, Costa PF. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2013; 31: 750-8.
15. Muszalska I, Kiaszewicz, Kson D, Sobczak A. Deterioration of Niacinamide (Vitamin B₃) in Cosmetic Products Using Differential Spectrophotometry and Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Analytical Chemistry*. 2013; 68: 1007-13.
16. Lorencini M, Brohem CA, Dieamant GC, Zanchin NI, Maibach HI. Active ingredients against epidermal aging. *Ageing Research Reviews*. 2014; 15: 100-15.
17. Onder M, Kaymak Y. An Investigation of Efficacy of Topical Niacinamide for the Treatment of Mild and Moderate Acne Vulgaris. *J Turk Acad Dermatol*. 2008; 2 (4).
18. Solis JN, Cazares JP, Alvarez BT, Ovalle CO, Ahumada CF, Gonzalez FJ et al. A Double-Blind, Randomized Clinical Trial of Niacinamide 4% versus Hydroquinone 4% in the Treatment of Melasma. *Dermatology Research and Practice*. 2011.
19. Thomas S, Bharti A, Tharpa K, Agarwal A. Quantification of potential impurities by a stability indicating UV-HPLC method in niacinamide active pharmaceutical ingredient. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012; 60: 86-9.
20. Lee JY, Kim YK, Seo JY, Cho CW, Hwang JS, Lee BG et al. Loss of elastic fibers causes skin wrinkles in sun-damaged human skin. *Journal of Dermatological Science*. 2008; 50: 99-107.
21. Kambayachi H, Yamashita M, Odake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *Journal of Dermatological Science*. 2001; 27: 19-25.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

22. Zussman J, Ahdout J, Kim J. Vitamins and photoaging: Do scientific data support their use. *J Am Acad Dermatol.* 2010; 63: 507-25.
23. Brandt FS, Cazzaniga A. Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. *Clinical Interventions in Aging.* 2008; 3 (1): 153-9.
24. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid A Key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology.* 2012; 3: 253-8.
25. Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progerss in Neurobiology* 2008; 85: 335-53.
26. Rousselot DB, Collin F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology.* 2010; 278: 55-67.
27. Amnuakit T, Maneenuan D, Boonme P. Evaluation of caffeine Gels on Physiocochemical Characteristics and In Vivo Efficacy in Reducing Puffy Eyes. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2010; 02: 56-9.
28. Wright KP, Badia P, Myer BL, Plenzler SC, Hakel M. Caffeine and light effect on nighttime melatonin and temperature levels in sleep-deprived humans. *Brain Research.* 1997; 747: 78-84.
29. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta.* 2000; 295: 141-54.
30. Velasco MV, Tano CT, Santelli GM, Consiglieri VO, Kaneko TM, Baby AR. Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: histological evaluation. *Journal of Cosmetic Dermatology.* 2008; 7: 23-9.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

31. Devani AP, Dabhade SM, Bakal RL, Gadewar CK, Chandewa AV. Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation. *Arabian Journal of Chemistry*. 2013.
32. The Official Compendia of Standards. U.S. Pharmacopeia & National Formulary. Rockville, National Publishing. 2000. p 1178.
33. AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemistry. 18 th ed. Arlington, Virginia, Appendix D. page 9/Appendix E. page 2-3.
34. Clemen P, Laugel C, Marty JP. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. *Journal of Controlled Release*. 2000; 66: 243-54.
35. Nicoloi S, Zani F, Bilzi S, Bettini R, Santi P. Association of nicotinamide with paraben: Effect on solubility, partition and transdermal permeation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008; 69: 613-21.
36. Woziwodzka A, Gwizdex WA, Piosik J. Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines. *Bioorganic chemistry*. 2011; 39: 10-7.
37. Higuchi T, Pitman IH. Caffeine complexes with low water solubility: Synthesis and dissolution rate of 1:1 and 1:2 caffeine-gentisic acid complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1973; 62: 55-8.
38. Higuchi T, John LL. Investigation of some complexes formed in solution by caffeine. IV. Interactions between caffeine and sulfathiazole, sulfadiazine, p-aminobenzoic acid, benzocaine, phenobarbital, and barbital. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 1954; 43: 349-54.
39. Hossain MM, Chong WE. Anew Approach for Removal of Caffeine from Coffee using Sunflower Oil. *WCE*. 2011; 3.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ก.1

ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของโนอาซิโนไมด์
ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

| ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$) | รีเทนชันไทม์ (นาที) | ค่าเฉลี่ย | พื้นที่ใต้พีค | ค่าเฉลี่ย |
|-------------------------------------|------------------------|-----------|---------------|-----------|
| 5 | | | | |
| n1 | 4.05 | | 1589221 | |
| n2 | 4.01 | 4.02 | 1660673 | 1631128 |
| n3 | 4 | | 1643490 | |
| 10 | | | | |
| n1 | 4.05 | | 3579824 | |
| n2 | 4.07 | 4.05 | 3588021 | 3592272 |
| n3 | 4.03 | | 3608971 | |
| 20 | | | | |
| n1 | 4.00 | | 6880562 | |
| n2 | 4.00 | 4.00 | 6804032 | 6959865 |
| n3 | 4.00 | | 7195002 | |
| 30 | | | | |
| n1 | 4.06 | | 9983988 | |
| n2 | 4.08 | 4.07 | 10232403 | 10066778 |
| n3 | 4.07 | | 9983942 | |
| 50 | | | | |
| n1 | 4.05 | | 16470874 | |
| n2 | 4.1 | 4.05 | 16617082 | 16598982 |
| n3 | 4 | | 16708991 | |

ตารางที่ ก.2

ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของคาเฟอีน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

| ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$) | รีเทนชันไทม์ (นาที) | ค่าเฉลี่ย | พื้นที่ใต้พีค | ค่าเฉลี่ย |
|-------------------------------------|------------------------|-----------|---------------|-----------|
| 5 | | | | |
| n1 | 9.76 | | 1283354 | |
| n2 | 9.76 | 9.73 | 1305886 | 1312416 |
| n3 | 9.67 | | 1348008 | |
| 10 | | | | |
| n1 | 9.73 | | 3032085 | |
| n2 | 9.76 | 9.75 | 2903601 | 2983301 |
| n3 | 9.76 | | 3014217 | |
| 20 | | | | |
| n1 | 9.81 | | 5766569 | |
| n2 | 9.8 | 9.78 | 5666835 | 5709207 |
| n3 | 9.73 | | 5694217 | |
| 30 | | | | |
| n1 | 9.86 | | 8530143 | |
| n2 | 9.91 | 9.86 | 8432796 | 8496242 |
| n3 | 9.81 | | 8525786 | |
| 50 | | | | |
| n1 | 9.83 | | 13991136 | |
| n2 | 9.78 | 9.80 | 13980229 | 13701030 |
| n3 | 9.79 | | 13131724 | |

ภาคผนวก ข
ข้อมูลการแพร่ผ่านของไนอาซิनाไมด์และคาเฟอีนผ่านเมมเบรน
โดยใช้ Franz-type diffusion cells

ตารางที่ ข.1
ข้อมูลการแพร่ผ่านของไนอาซิनाไมด์ผ่านเมมเบรนในตำรับเจล

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของไนอาซิनाไมด์ (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|---------------------------------------|---------|---------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 14.5022 | 14.6881 | 15.0588 | 14.7497 |
| 2 | 18.2517 | 18.0184 | 17.8784 | 18.0495 |
| 3 | 23.3965 | 23.3491 | 23.4935 | 23.4130 |
| 4 | 25.6055 | 25.6248 | 25.4319 | 25.5540 |
| 5 | 26.2612 | 26.1128 | 26.1109 | 26.1616 |
| 6 | 26.4063 | 26.4761 | 26.548 | 26.4768 |
| 8 | 27.1424 | 27.0432 | 27.0562 | 27.0806 |
| 10 | 28.2691 | 28.1455 | 28.1883 | 28.2009 |
| 20 | 29.2828 | 29.1880 | 29.2235 | 29.2314 |
| 24 | 29.4180 | 29.2663 | 29.3496 | 29.3446 |

ตารางที่ ข.2

ข้อมูลการแพร่ผ่านของไนอาซิनाไมด์ผ่านเมมเบรนในตำรับวานิชซิงค์ครีม

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของไนอาซิनाไมด์ (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|---------------------------------------|---------|---------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 4.3507 | 4.2528 | 4.2533 | 4.2856 |
| 2 | 7.1316 | 6.9434 | 7.0126 | 7.0292 |
| 3 | 9.3564 | 9.9875 | 9.9185 | 9.7541 |
| 4 | 14.0408 | 13.9714 | 13.7548 | 13.9223 |
| 5 | 15.0108 | 14.7585 | 14.6758 | 14.8150 |
| 6 | 15.5276 | 15.5749 | 15.6202 | 15.5742 |
| 8 | 16.5625 | 16.4826 | 16.4604 | 16.5018 |
| 10 | 17.4348 | 17.2266 | 17.2851 | 17.3155 |
| 20 | 18.1666 | 17.9932 | 18.0792 | 18.0797 |
| 24 | 18.7028 | 18.3889 | 18.4020 | 18.4979 |

ตารางที่ ข.3

ข้อมูลการแพร่ผ่านของไนอาซิनाไมด์ผ่านเมมเบรนในตำรับไฮโดรฟิลิกอิมัลชัน

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของไนอาซิनाไมด์ (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|---------------------------------------|---------|---------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 2.8102 | 2.7956 | 2.7077 | 2.7712 |
| 2 | 3.7166 | 3.6397 | 3.7707 | 3.7090 |
| 3 | 5.3399 | 5.3918 | 5.2946 | 5.3421 |
| 4 | 7.2470 | 6.9967 | 7.1691 | 7.1376 |
| 5 | 7.9265 | 7.6274 | 7.7187 | 7.7575 |
| 6 | 8.5397 | 8.4411 | 8.4539 | 8.4782 |
| 8 | 9.3785 | 8.9762 | 9.0053 | 9.1200 |
| 10 | 9.6834 | 9.4661 | 9.5908 | 9.5801 |
| 20 | 10.2982 | 10.0573 | 10.1571 | 10.1709 |
| 24 | 10.9619 | 10.5822 | 10.6952 | 10.7464 |

ตารางที่ ข.4

ข้อมูลการแพร่ผ่านของไนอาซิनाไมด์ผ่านเมมเบรนในตำรับโคลด์ครีม

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของไนอาซิनाไมด์ (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|---------------------------------------|--------|--------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.7409 | 0.7357 | 0.7277 | 0.7348 |
| 2 | 0.9418 | 0.9262 | 0.9246 | 0.9309 |
| 3 | 1.2520 | 1.2445 | 1.2310 | 1.2425 |
| 4 | 1.3650 | 1.3528 | 1.3442 | 1.3540 |
| 5 | 1.4527 | 1.4406 | 1.4338 | 1.4424 |
| 6 | 1.5279 | 1.5154 | 1.5072 | 1.5168 |
| 8 | 1.5930 | 1.5675 | 1.5750 | 1.5785 |
| 10 | 1.6720 | 1.6606 | 1.6520 | 1.6615 |
| 20 | 1.7462 | 1.7328 | 1.7256 | 1.7349 |
| 24 | 1.7973 | 1.7818 | 1.7843 | 1.7878 |

ตารางที่ ข.5

ข้อมูลการแพร่ผ่านของคาเฟอีนผ่านเมมเบรนในตำรับเจล

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของคาเฟอีน (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|----------------------------------|---------|---------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 4.9825 | 4.9595 | 4.9699 | 4.9706 |
| 2 | 7.1763 | 7.2163 | 7.2198 | 7.2041 |
| 3 | 9.5518 | 9.5986 | 9.5881 | 9.5795 |
| 4 | 11.2388 | 11.1698 | 11.25 | 11.2195 |
| 5 | 11.8247 | 11.7557 | 11.696 | 11.7588 |
| 6 | 12.3342 | 12.3735 | 12.3147 | 12.3408 |
| 8 | 13.7368 | 13.6544 | 13.6793 | 13.6901 |
| 10 | 14.1996 | 14.1374 | 14.1857 | 14.1742 |
| 20 | 14.621 | 14.5559 | 14.5641 | 14.5803 |
| 24 | 14.7574 | 14.6855 | 14.6855 | 14.7094 |

ตารางที่ ข.6

ข้อมูลการแพร่ผ่านของคาเฟอีนผ่านเมมเบรนในตำรับวานิลลาชิ่งครีม

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของคาเฟอีน (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|----------------------------------|--------|--------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0000 |
| 1 | 1.611 | 1.8946 | 1.6741 | 1.7266 |
| 2 | 3.3863 | 3.8333 | 3.6547 | 3.6248 |
| 3 | 4.6611 | 4.6999 | 4.7117 | 4.6909 |
| 4 | 6.2979 | 6.3061 | 6.272 | 6.2920 |
| 5 | 6.8285 | 6.7973 | 6.7451 | 6.7903 |
| 6 | 7.3323 | 7.2881 | 7.2427 | 7.2877 |
| 8 | 8.071 | 8.0268 | 7.957 | 8.0183 |
| 10 | 8.9104 | 8.8648 | 8.9711 | 8.9154 |
| 20 | 9.6656 | 9.6451 | 9.5924 | 9.6344 |
| 24 | 10.0012 | 9.99 | 9.9398 | 9.9770 |

ตารางที่ ข.7

ข้อมูลการแพร่ผ่านของคาเฟอีนผ่านเมมเบรนในตำรับไฮโดรฟลิกอิมัลชัน

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของคาเฟอีน (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|----------------------------------|--------|--------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0000 |
| 1 | 1.5854 | 1.6041 | 1.5179 | 1.5691 |
| 2 | 3.1239 | 3.0795 | 3.0962 | 3.0999 |
| 3 | 3.7064 | 3.6452 | 3.6603 | 3.6706 |
| 4 | 4.4445 | 4.4069 | 4.3887 | 4.4134 |
| 5 | 5.2548 | 5.1492 | 5.1825 | 5.1955 |
| 6 | 6.2893 | 6.2022 | 6.2267 | 6.2394 |
| 8 | 7.0981 | 7.1838 | 7.0811 | 7.1210 |
| 10 | 7.2655 | 7.3662 | 7.2781 | 7.3033 |
| 20 | 8.1781 | 8.075 | 8.0661 | 8.1064 |
| 24 | 8.5698 | 8.5742 | 8.6 | 8.5813 |

ตารางที่ ข.8

ข้อมูลการแพร่ผ่านของคาเฟอีนผ่านเมมเบรนในตำรับโคลด์ครีม

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณสะสมของคาเฟอีน (มิลลิกรัม) | | | |
|-------------------|----------------------------------|--------|--------|-----------|
| | n1 | n2 | n3 | ค่าเฉลี่ย |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0000 |
| 1 | 0.7087 | 0.702 | 0.7166 | 0.7091 |
| 2 | 0.8902 | 0.8832 | 0.8799 | 0.8844 |
| 3 | 1.0347 | 1.0439 | 1.0227 | 1.0338 |
| 4 | 1.1379 | 1.1316 | 1.1238 | 1.1311 |
| 5 | 1.2048 | 1.1972 | 1.1906 | 1.1975 |
| 6 | 1.2702 | 1.2625 | 1.2561 | 1.2629 |
| 8 | 1.3354 | 1.3278 | 1.3213 | 1.3282 |
| 10 | 1.4007 | 1.393 | 1.387 | 1.3936 |
| 20 | 1.4662 | 1.4762 | 1.4519 | 1.4648 |
| 24 | 1.5282 | 1.5224 | 1.5166 | 1.5224 |

