

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาครีมจากสารสกัดยาห้าราก

กุลสิริ พิรินธิ์อัครเดช*, สุรพจน์ วงศ์ใหญ่†, นันทพงศ์ ขำทอง*, ณิราวรรณ กิจประไพอำพล†, นงลักษณ์ สติธัยกาญจน์†, ยุพาภรณ์ สำเภาพันธ์‡

* วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ตำบลหลักหก อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000

† วิทยาลัยเฮลท์ แอนด์ เวลเนส มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์ แขวงทุ่งสองห้อง เขตหลักสี่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10210

‡ ผู้รับผิดชอบบทความ: nu_pharx@hotmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ตำรับยาห้ารากเป็นตำรับยาแผนโบราณแก้ไข้ชนิดรับประทานในบัญชียาหลักแห่งชาติ ด้านสมุนไพรตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ประกอบด้วยส่วนรากของตัวยาสุมไพร 5 ชนิด คือ ชิงชัน ยานาง คนทา เท้ายายม่อม และมะเดื่ออุทุมพร การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องพบว่าตำรับยานี้มีฤทธิ์ด้านการแพ้แบบปฏิกิริยา อิมมูน ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และไม่พบการระคายเคืองต่อผิวหนังคน จึงจัดว่ามีความปลอดภัยในการใช้เป็นยาภายนอกกับผิวหนังและมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยาใช้ภายนอกเพื่อรักษาผื่นคันจากภูมิแพ้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับครีมจากสารสกัดแห้งของตำรับยาห้ารากและพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อการควบคุมคุณภาพ รวมถึงการศึกษาความคงสภาพทางเคมีและกายภาพของตำรับครีม

วิธีการศึกษา: การเตรียมสารสกัดแห้งของตำรับยาห้ารากโดยสกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำ (aqueous decoction) และทำให้แห้งด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) และการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณองค์ประกอบสำคัญโดยใช้กรดเปอร์โฟราติก (perforatic acid) เป็นสารมาตรฐานเพื่อควบคุมคุณภาพสารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยประเมินความใช้ได้ของวิธีตามแนวทาง ICH Q2(R1) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ครีมชนิดน้ำมันในน้ำ ทำการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ปริมาณกรดเปอร์โฟราติกในตำรับครีม รวมถึงสมบัติการใช้งานของแต่ละสูตรเพื่อคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมที่สุด สุดท้ายดำเนินการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ครีมตามแนวทางการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ยา พ.ศ. 2556 ของอาเซียน ภายใต้ 2 สภาวะ คือ สภาวะอุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส ไม่ระบุความชื้นสัมพัทธ์) และสภาวะเร่ง (40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$) เป็นระยะเวลา 6 เดือน พร้อมทั้งคำนวณอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์

ผลการศึกษา: การสกัดสุมไพรตำรับยาห้ารากโดยวิธีการต้มด้วยน้ำพบว่าได้อัตราส่วนของสุมไพรต่อน้ำหนักสารสกัดแห้งเท่ากับ 7.3:1 จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีมีความเฉพาะเจาะจง โดยสังเกตจากความบริสุทธิ์ของพีคกรดเปอร์โฟราติกในโครมาโทแกรมของสารสกัด กราฟมาตรฐานของกรดเปอร์โฟราติกมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 8.28-69.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การวิเคราะห์เท่ากับ 0.9997 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำมีค่าไม่เกิน 2% ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.0-102.0% ชัดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณและการตรวจพบเท่ากับ 0.34 และ 0.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการ

พัฒนาสูตรครีม พบว่าครีมสูตรที่ 3 ที่ประกอบด้วย น้ำบริสุทธิ์ ร้อยละ 67, propylene glycol ร้อยละ 10, liquid paraffin ร้อยละ 6, cetyl alcohol ร้อยละ 5, Lexemul® 561 ร้อยละ 4.5, stearyl alcohol ร้อยละ 4, สารสกัดยาห้าราก ร้อยละ 2.5, และ Spectrastat BHLTM ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก มีลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุด ได้แก่ เนื้อครีมเนียนละเอียด ไม่แยกชั้น มีกลิ่นสมุนไพรอ่อน ๆ และให้ผิวสัมผัสที่ดี ผ่านเกณฑ์ควบคุมคุณภาพของครีมตามข้อกำหนดของตำรายา โดยตรวจพบปริมาณกรดเปอร์โฟราติก ในสารสกัดเท่ากับร้อยละ 1.38 โดยน้ำหนัก และตำรับครีมเท่ากับ 32.52 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 100 กรัม ผลการศึกษาความคงสภาพเป็นเวลา 6 เดือนพบว่าครีมมีความคงตัวทั้งในสภาวะเร่งและในอุณหภูมิห้อง โดยสามารถประมาณอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์ (estimated shelf life) ได้ที่ 25 เดือน

อภิปรายผล: วิธีการเตรียมสารสกัดใช้ภูมิปัญญาแพทย์แผนไทยโดยการต้มสกัดด้วยน้ำแบบดั้งเดิมและทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอยซึ่งช่วยให้สารสกัดคงคุณภาพโดยลดการเสื่อมสลายจากความร้อน งานวิจัยได้พัฒนาและประเมินวิธีวิเคราะห์กรดเปอร์โฟราติกด้วย RP-HPLC ที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ICH Q2(R1) ทำให้ควบคุมคุณภาพสารสกัดและครีมได้อย่างแม่นยำ สำหรับพัฒนาสูตรครีมใช้สารสกัดยาห้ารากความเข้มข้นร้อยละ 2.5% โดยน้ำหนัก โดยสูตรที่ 3 ให้ผลดีที่สุด มีเนื้อครีมเนียนละเอียด pH 4.93 ± 0.03 ความหนืด $65,848 \pm 2,463$ cP ปริมาณกรดเปอร์โฟราติก 32.52 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 100 กรัม ครีมมีความคงตัวทั้งลักษณะทางกายภาพ ความหนืด และสารออกฤทธิ์ตลอด 180 วัน ภายใต้การเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง โดยปริมาณสารเปลี่ยนแปลงลดลงไม่เกิน 2.1% สะท้อนถึงความเสถียรและคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาต่อเนื่องในงานวิจัยทางคลินิก

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: ตำรับครีมยาห้ารากที่พัฒนาได้มีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสม มีความคงตัว และมีคุณภาพตามมาตรฐานตำรายา เสนอให้ดำเนินการศึกษาในมนุษย์เพิ่มเติม เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตำรับในการรักษาอาการผื่นแพ้ต่อไป

คำสำคัญ: ครีมยาห้าราก, สารสกัดน้ำ, กรดเปอร์โฟราติก, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Development of a Herbal Cream Formulation from Ya Ha Rak Extract

Kulasiri Piranitiakradej^{*}, Surapote Wongyai[†], Nanthaphong Khamthong^{*},
Nirawan Kitprapiumpon[†], Nonglak Satitkarn[†], Yupaporn Sampaopan^{*‡}

^{*} College of Oriental Medicine, Rangsit University, Lak Hok, Mueang Pathum Thani District Pathum Thani 12000, Thailand

[†] College of Health and Wellness, Dhurakijpundit University, Thung Song Hong, Lak Si, Bangkok 10210, Thailand

[‡] Corresponding author: nu_pharx@hotmail.com

Abstract

Introduction and Objectives: The “Ya Ha Rak”, an oral traditional Thai herbal formula for treating fever, has officially been listed in the National List of Essential Herbal Medicines since 1999. It consists of the roots of five medicinal plants: chingchi (*Capparis micracantha* DC.), Ya Nang (*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels), Khontha (*Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.), Tao Yai Mom (*Clerodendrum indicum* (L.) Kuntze) and Ma Duea U Thum Phon (*Ficus racemosa* L.). Investigations into biological activity studies revealed that Ya Ha Rak exhibits anti-allergic activity through the inhibition of immune reactions, melanogenesis and tyrosinase inhibition, as well as antioxidant activity. No skin irritation was observed in human skin, indicating that the formula is safe for topical application. Therefore, it has the potential to be used externally for the treatment of allergic dermatitis. This study aimed to develop a cream formulation incorporated with Ya Ha Rak spray-dried extract and to establish an analytical

method for quality control, including the evaluation of the chemical and physical stability of the cream formulation.

Methods: The dried *Ya Ha Rak* herbal formula extract was prepared by aqueous decoction extraction followed by spray drying. Subsequently, an analytical method employing reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was developed for the quantification of the marker compound, perforatic acid, to ensure the quality control of the obtained extract. The method was further validated by ICH Q2(R1) guidelines. Then, the obtained extract was formulated into an oil-in-water cream. The physical characteristics, the amount of perforatic acid within the cream formulation, and the functional properties of each formula were evaluated to select the most suitable formulation. Finally, the stability study of the chosen cream product was conducted by the ASEAN Guidelines for the Stability Study of Drug Products (2013) under two conditions: room temperature ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, without controlled relative humidity) and accelerated condition ($40 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ relative humidity) for 6 months, with subsequent estimation of the product shelf life.

Results: The *Ya Ha Rak* extract obtained from spray drying exhibited a herb-to-dry extract weight ratio of 7.3:1. The method validation yielded the following results. The specificity of the analytical method was evidenced by the purity of the perforatic acid peak in the chromatogram of *Ya Ha Rak* extract. The calibration curve for perforatic acid was linear over the concentration range of 8.68–79.0 $\mu\text{g/mL}$, with r^2 of 0.9997. The relative standard deviation (RSD) for repeatability was within 2%. The percentage recovery ranged from 98.0% and 102.0%. The limit of quantitation (LOQ) and limit of detection (LOD) were determined to be 0.34 $\mu\text{g/mL}$ and 0.07 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The development of cream formulations revealed that Formulation 3, comprising 67% purified water, 10% propylene glycol, 6.5% liquid paraffin, 5% cetyl alcohol, 4.5% Lexemul® 561, 4% stearyl alcohol, 2.5% *Ya Ha Rak* extract, and 0.5% Spectrastat BHLTM by weight, exhibited superior physical characteristics, including a smooth, homogeneous texture without phase separation, a mild herbal scent, and a pleasant skin feel. The formulation complied with the quality control criteria specified in the pharmacopoeia. The content of perforatic acid found was determined to be 1.38% w/w in the extract and 32.52 mg per 100 g of cream formulation. A six-month stability study demonstrated that the cream formulation exhibited physical and chemical stability under both accelerated and room-temperature storage conditions. The estimated shelf life of the product was determined to be 25 months.

Discussion: The extraction method employed Thai traditional medicine practices by using water decoction followed by spray drying, which effectively preserves the quality of the extract by minimizing thermal degradation. The quantitative analysis of perforatic acid using RP-HPLC was developed and validated following ICH Q2(R1) guidelines, ensuring accurate quality control of both the extract and cream formulations. For the cream development using 2.5% w/w concentration of the herbal extract, formulation 3 exhibited the most favourable properties, including a smooth texture, pH of 4.93 ± 0.03 , and viscosity of $65,848 \pm 2,463$ cP. The perforatic acid content was found to be 32.52 mg per 100 g of cream. Stability studies conducted over 180 days under both room temperature and accelerated conditions demonstrated excellent stability in physical appearance, viscosity, and active compound content, with the percentage reduction in perforatic acid not exceeding 2.1%. These results indicate that the developed formulation possesses adequate stability and quality for further clinical investigation.

Conclusion and Recommendation: The developed *Ya Ha Rak* cream formulation demonstrated suitable physical characteristics, satisfactory stability, and complied with the quality standards in the pharmacopoeia. It is recommended that further in vivo studies, particularly in human subjects be conducted to assess the efficacy and safety of the formulation for the treatment of allergic dermatitis.

Key words: *Ya Ha Rak* cream, water extract, perforatic acid, HPLC

บทนำและวัตถุประสงค์

ผื่นคันเป็นอาการทางผิวหนังที่พบได้บ่อยในคนทุกช่วงวัย โดยเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การแพ้สารเคมี การติดเชื้อ ความร้อน หรือภาวะภูมิแพ้ อาการผื่นคันไม่เพียงแต่สร้างความไม่สบายกาย แต่ยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตและสุขภาพจิตของผู้ป่วย ปัจจุบันมีการใช้ยาและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อบรรเทาอาการผื่นคัน เช่น ยาสเตียรอยด์และยาต้านฮีสตามีน อย่างไรก็ตามการใช้ยาเหล่านี้ในระยะยาวอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้ จึงมีแนวโน้มในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีความปลอดภัยและอ่อนโยนต่อผิวหนังมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษา

ตำรับยาห้ารากจากตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ในคัมภีร์ตักศิลา ประกอบด้วยรากสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ คนทา (*Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.), ชิงชี (*Capparis micracantha* D.C), เห่ายายม่อม (*Clerodendrum indicum* (L.) Kuntze), มะเดื่ออุทุมพร (*Ficus racemosa* L.), และ ย่านาง (*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels) เป็นตำรับยาแผนโบราณที่มีบทบาทสำคัญในระบบการแพทย์ไทยมาอย่างยาวนาน ด้วยสรรพคุณช่วยแก้ไข้ ถอนพิษไข้ และรักษาอาการไข้ที่มีผื่นร่วม^[1] จนได้รับการบรรจุในบัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพรหมวดหมู่ยาแก้ไข้ของกระทรวงสาธารณสุขในสถานการณ์โรคโควิด-19 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563 เป็นต้นมา ตำรับยาห้ารากได้รับความสนใจมากขึ้น^[2] มีการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์การต้านอักเสบ^[3-6] ต้านอนุมูลอิสระ^[3,7-10] ต้านจุลชีพและยับยั้งเชื้อโรคบางชนิด^[11-12] ยับยั้งเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดอาการคันและผื่นแพ้^[13] นอกจากการใช้เป็นยารับประทาน ตำรับยาห้ารากยังถูกนำมาใช้ภายนอกเพื่อบรรเทาผื่นคัน

โดยนำผงยาละลายน้ำทาหรือต้มอาบ^[14]

การวิเคราะห์สารสำคัญในสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), Gas Chromatography (GC) และ High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเฉพาะเทคนิค Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ซึ่งได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในงานวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี เนื่องจากมีความไวและความแม่นยำสูง Juckmeta และคณะ^[6] ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค RP-HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในตำรับยาห้าราก ได้แก่ กรดเปอรိုไพราติก O-methylalloptaeroxynin และ pectolinarigenin อย่างไรก็ตาม การศึกษาดังกล่าวยังไม่ได้มีการตรวจรับรอง (validation) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้

กรดเปอรိုไพราติกเป็นสารประกอบในกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ที่พบเฉพาะในรากคนทา และไม่พบในสมุนไพรชนิดอื่นของตำรับยาห้าราก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารนี้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินหายใจบางชนิด รวมทั้งแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ แม้ว่าฤทธิ์ดังกล่าวจะไม่สูงมากนัก^[6] อย่างไรก็ตาม พบว่ากรดเปอรိုไพราติกมีปริมาณสูงเป็นสารหลัก (main compound) ทั้งในตัวอย่างรากคนทาและในตำรับยาห้าราก ดังนั้น จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงสำหรับการควบคุมคุณภาพ^[15] ของตำรับยาห้าราก ทั้งในด้านการประเมินความคงตัวและการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสูตรตำรับ

ปัจจุบันมีแนวโน้มในการพัฒนาสารสกัดจากตำรับยาตำรากรเป็นผลิตภัณฑ์ภายนอก^[16-17] เช่น ครีมหรือเจลสมุนไพรที่สามารถฟื้นฟูผิว ลดการเสื่อมสภาพของผิว^[18-20] และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Cutibacterium acnes*^[21-22] ซึ่งเป็นสาเหตุของสิว สอดคล้องกับความต้องการผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในตลาดโลกที่กำลังเติบโต และเป็นไปตามพระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562^[23] ที่สนับสนุนความหลากหลายของผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย

ด้วยศักยภาพของตำรับยาตำรากรในการพัฒนาเป็นยาใช้ภายนอกสำหรับรักษาผื่นคัน การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนาตำรับครีมจากสารสกัดของยาตำรากรในรูปแบบครีมชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water, o/w) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถดูดซึมผ่านผิวได้ดี ให้ความรู้สึกเย็นสบาย ไม่อุดตันรูขุมขน และล้างออกได้ง่าย ทั้งยังช่วยเพิ่มความคงตัวและประสิทธิภาพในการนำส่งสารสำคัญ ลดผลข้างเคียงจากการใช้ยารับประทานซึ่งอาจกระทบต่ออวัยวะภายใน และเพิ่มความสะดวกให้ผู้ป่วยในการบริหารยาด้วยตนเองและหยุดใช้ได้ทันทีเมื่อเกิดอาการแพ้^[24-25]

การศึกษานี้จะเน้นพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดเปอร์โฟราติกในสารสกัดของยาตำรากรและในผลิตภัณฑ์ครีมซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่พบในตำรับยาตำรากรซึ่งมีอยู่ในต้นคนทา^[6] ด้วยวิธี RP-HPLC ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตำรับครีม รวมถึงประเมินความคงสภาพและอายุการใช้ของตำรับครีมที่พัฒนาขึ้น เพื่อยกระดับมาตรฐานของยาสมุนไพรไทยและเกิดการสร้างนวัตกรรมยาสมุนไพรต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Niro® Spray Dryer for PRODUCTION MINOR with Rotary Atomizer, Model 0130-1030 1703en, Niro A/S, Soeborg, Denmark) เครื่อง high performance liquid chromatography-diode array detector (Thermo separation, USA) ประกอบด้วย Spectra system P2000 pump, Spectra system AS3000 Autosampler, Spectra system UV6000 detector บันทึกข้อมูลและแปลผลด้วยโปรแกรม Chrom-Quest® chromatography data system (Thermo Fisher Scientific, USA), เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Mettler AE240, Switzerland), เครื่องเขย่าความถี่สูง (GT sonic, China), เครื่องปั่นเหวี่ยง (Rotofix 32A Hettich, Germany)

1.2 สารเคมีและสมุนไพร

Purified water HPLC grade (Labscan, Thailand), acetonitrile HPLC grade (Burdick & Jackson, USA), glacial acetic acid AR grade (Merck, Germany), methanol AR grade (Merck, Germany), dimethylsulfoxide (DMSO) (Merck, Germany), สารมาตรฐานกรดเปอร์โฟราติก (แยกบริสุทธิ์จากรากคนทา และได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารด้วยเทคนิค NMR, MS และ HPLC) และสารเคมีสำหรับการเตรียมตำรับครีมพื้น (cosmetic grade) : stearyl alcohol, cetyl alcohol,

liquid paraffin, Lexemul® 561, ceteareth-25, propylene glycol, spectrastat BHL™

รากคนทา รากชิงชี รากมะเดื่ออุทุมพร รากท้ายม่อม และรากย่านาง จัดซื้อจากร้านเวชพงศ์โอสถ กรุงเทพฯ

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมสารสกัดยาห้าราก

สมุนไพรทั้ง 5 ชนิดในตำรับยาห้าราก จำนวนชนิดละ 2 กิโลกรัม ถูกนำมาบดเป็นผงหยาบ จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่นปริมาณ 50 ลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วกรองเพื่อแยกกากสมุนไพรออก สารสกัดน้ำที่ได้ถูกนำไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) โดยใช้สภาวะในการทำแห้ง ดังนี้: อุณหภูมิเข้า 175 องศาเซลเซียส อัตราการพ่น 3.61 มิลลิลิตรต่อวินาที โดยใช้ maltodextrin และ Aerosil® (200:1) เป็นตัวพาสารสกัดแห้งที่ได้ถูกเก็บในภาชนะปิดสนิท และเก็บรักษาในตู้ควบคุมความชื้น ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1 ตัวอย่างสารสกัดตำรับยาห้าราก

ซึ่งตัวอย่างสารสกัดยาห้าราก 30 มิลลิกรัม ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ DMSO 2 มิลลิลิตร และเมทานอล 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล กรองด้วยเมมเบรนไนลอนขนาด 0.22 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

2.2.2 ตัวอย่างตำรับครีมสารสกัดยาห้าราก

ซึ่งตัวอย่างครีมปริมาณ 1 กรัม ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเมทานอล 15

มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเขย่าในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เก็บส่วนใสใสในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำเมทานอลจนถึงปริมาตรที่กำหนด กรองด้วยเมมเบรนไนลอน ขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

2.3 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดเปอรโฟราติกในสารสกัดยาห้าราก

การวิเคราะห์ดำเนินการด้วยเทคนิค RP-PHLC โดยใช้คอลัมน์ VDSpher PUR 100 C18-E, ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย 2% acetic acid in water (v/v) (A) และ acetonitrile (B) ซึ่งใช้รูปแบบการผสมสารละลายแบบการไหลไล่สัดส่วน (gradient elution) ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดสารสำคัญที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร เป็นเวลา 60 นาที โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (standard stock solution)

เตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น โดยละลายกรดเปอรโฟราติก ด้วยเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.3.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเปอรโฟราติก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ความเข้มข้น โดยทำการเจือจางจากสารละลายมาตรฐานตั้งต้น แล้ววิเคราะห์ peak area ด้วยเครื่อง HPLC นำผลลัพธ์

ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานโดยกำหนดแกนนอน (x) เป็นความเข้มข้นของกรดเปอรโฟราติก และแกนตั้ง (y) เป็นค่า peak area

2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ และเกณฑ์การยอมรับ

ประเมินโดยอิงแนวทางของ ICH Q2(R1)^[26] เพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณในห้องปฏิบัติการ โดยพิจารณาตามหัวข้อหลัก ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (specificity), ความเป็นเส้นตรง (linearity), ความเที่ยง (precision), ความถูกต้อง (accuracy), ช่วงการวิเคราะห์ (range) และขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD/LOQ)

2.4.1 ความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ศึกษาจากความบริสุทธิ์ของพีคกรดเปอรโฟราติกในลายพิมพ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดยาห่ารากและตำรับครีม เปรียบเทียบกับพีคของสารมาตรฐานกรดเปอรโฟราติก

2.4.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และ ช่วงการวิเคราะห์ (range)

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่า peak area โดยวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นด้วยวิธี least squares และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การวิเคราะห์ (r^2) ซึ่งกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์การวิเคราะห์ ต้องมากกว่า 0.999

2.4.3 การศึกษาความเที่ยงของวิธี (precision)

โดยการทำซ้ำและคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) (เกณฑ์ยอมรับ $\leq 2.0\%$) ในหัวข้อต่อไปนี้

(1) ศึกษาความเที่ยงของเครื่องมือวิเคราะห์ (Injection precision): ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดเปอรโฟราติก ซ้ำ 6 ครั้ง

(2) ศึกษาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Intraday precision): เตรียมและวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่างในวันเดียวกัน

(3) ศึกษาความเที่ยงระหว่างวัน (Interday precision): เตรียมและวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างวันละ 2 ตัวอย่าง เป็นเวลา 6 วัน

2.4.4 ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD/LOQ)

ศึกษาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ (LOD) และ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณได้ (LOQ) โดยพิจารณาจากค่า signal-to-noise ratio (S/N) โดยกำหนดค่า $S/N = 3$ สำหรับ LOD และ $S/N = 10$ สำหรับ LOQ

2.4.5 การศึกษาความถูกต้อง (accuracy)

เตรียม spiked sample โดยการเติมสารมาตรฐานกรดเปอรโฟราติก ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80, 100 และ 120 ของตัวอย่าง ลงในสารละลายตัวอย่างทำซ้ำระดับละ 6 ครั้ง คำนวณร้อยละการคืนกลับ (% recovery) โดยมีเกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 98.0 - 102.0%^[27] โดยใช้สูตร:

$$\% \text{Recovery} = (\text{ปริมาณที่วิเคราะห์ได้} \times 100) / \text{ปริมาณที่เติม}$$

2.5 การพัฒนาสูตรตำรับครีมสารสกัดห่าราก

ทำการเตรียมครีมชนิดน้ำมันในน้ำ โดยมีส่วนประกอบตาม Table 1 ทำการแบ่งส่วนประกอบของตำรับออกเป็นวัฏภาคน้ำ และวัฏภาคน้ำมันให้ความร้อนจากไอน้ำร้อนโดยควบคุมอุณหภูมิของวัฏภาคน้ำให้สูงถึง 75 องศาเซลเซียส และวัฏภาคน้ำมันได้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เทวัฏภาคน้ำมันในวัฏภาคน้ำมัน นำไปปั่นต่อด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (IKA T18, Germany) ประมาณ 5 นาที คนต่อจนอุณหภูมิของการผสมเหลือ 40 องศาเซลเซียส ใส่สาร

กันเสีย และร่อนครีมเย็นลงจากนั้นบรรจุครีมลงในภาชนะแห้งสะอาดและปิดสนิท นำไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและเคมี ตามหัวข้อต่อไปนี้

- (1) ลักษณะภายนอก สี กลิ่น และการตกตะกอนหรือแยกชั้น
- (2) ความหนืด โดยใช้เครื่องวัดความหนืด (Brookfield, Germany)
- (3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH

meter (Sartorius PB10, Germany)

- (4) ปริมาณกรดเปอร์โฟราติกในครีม
คัดเลือกสูตรที่ให้ผลดีที่สุดทั้งในแง่ของลักษณะทางกายภาพและปริมาณของกรดเปอร์โฟราติกเพียง 1 สูตร นำมาศึกษาความคงสภาพของครีมตามแนวทางการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ยา ด้านสมุนไพร พ.ศ. 2556 ของอาเซียน^[28]

Table 1 Formulation of Ya Ha Rak cream

Ingredient	Function	Quantity (%w/w)		
		1	2	3
Stearyl alcohol	Stiffening agent	7	5	4
Cetyl alcohol	Stiffening agent	5	5	5
Liquid paraffin	Emollient	4	6	6.5
Lexemul® 561	Emulsifier	-	4	4.5
Cetareth- 25	Emulsifier	2	-	-
Propylene glycol	Humectant	10	10	10
Spectrastat BHL™	Preservative	0.5	0.5	0.5
Extract	Active	2.5	2.5	2.5
Purified Water qs to	Diluent	100	100	100

2.6 การศึกษาความคงสภาพทางเคมีกายภาพของครีม

ทดสอบความคงสภาพทางเคมีกายภาพของครีมภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 สภาวะ คือ สภาวะอุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส ไม่ระบุความชื้นสัมพัทธ์) ที่ 3, 6 เดือน และสภาวะเร่ง (40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$) ที่ 1, 3, 6 เดือน

2.7 การคำนวณอายุการใช้ครีมสารสกัดหำราก

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราการเสื่อม (k) ของครีมสารสกัดหำรากจะดำเนินการโดยใช้

Arrhenius equation ซึ่งใช้ในการคำนวณค่าคงตัวอัตราการเสื่อมที่สภาวะเร่ง และอุณหภูมิห้อง

ผลการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดหำราก

ได้สารสกัดเป็นผงละเอียดสีน้ำตาล โดยมีอัตราส่วนสมุนไพรแห้งต่อน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 7.3:1 การหาปริมาณความชื้นของสารสกัดโดยวิธีไทเทรชัน (Karl Fischer Titration) พบปริมาณน้ำเท่ากับร้อยละ 1.11 ± 0.16 ($n = 5$) โดยน้ำหนัก

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ในการทำมาตรฐาน (standardization) ของสารสกัดยาห้าราก โดยใช้วิธี RP HPLC ได้เลือกใช้ acetonitrile ผสมกับสารละลายของ acetic acid เข้มข้น 2%v (v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยมีการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ทั้งสองชนิดตามช่วงเวลา เพื่อให้สามารถแยกพีคของสารประกอบจากสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับยาห้ารากได้อย่างชัดเจนภายในเวลา 60 นาที โดยโปรแกรมการไล่ระดับเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้มีรายละเอียดดังนี้: ช่วงเวลา 1-10 นาที สัดส่วน A:B เท่ากับ 80:20, 10-20 นาที เท่ากับ 70:30, 20-30 นาที เท่ากับ 70:30, 30-40 นาที เท่ากับ 40:60, 40-50 นาที เท่ากับ 20:80 และ 50-60 นาที เท่ากับ 0:100 ดังแสดงใน Figure 1b

3. การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

3.1 ความจำเพาะเจาะจง

Figure 1a แสดงพีคของสารละลายมาตรฐานกรดเปอร์โฟราติกที่ retention time 26.55 นาที ส่วนโครมาโทแกรมของสารสกัด (Figure 1b) พบพีคที่เวลา 26.54 นาที ยืนยันว่าเป็นกรดเปอร์โฟราติก โดยพิจารณาจาก UV spectrum ของพีคทั้งสองสามารถซ้อนทับอย่างสมบูรณ์ (Figure 1c) ความบริสุทธิ์ที่ตรวจสอบจาก UV spectrum ที่จุดเริ่มต้น (26.24 นาที) จุดสูงสุด (26.54 นาที) และจุดสิ้นสุด (26.80 นาที) มีความเหมือนกันไม่มีสารอื่นรบกวน ดังแสดงใน Figure 1d

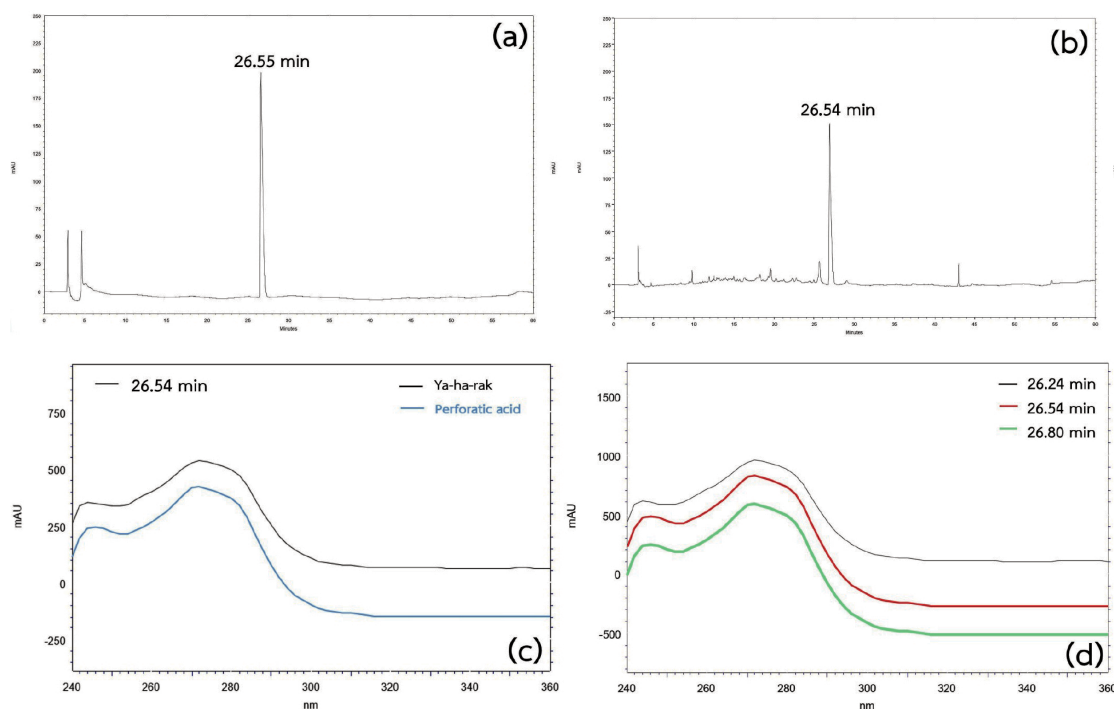


Figure 1 HPLC chromatograms of perforic acid standard solution (a) and Ya Ha Rak extract solution (b). Overlaid UV spectrum of perforic acid at 26.55 min and Ya Ha Rak extract at 26.54 min (c) and overlaid UV spectrum of Ya Ha Rak extract at 26.24, 26.54, 26.80 min (d)

3.2 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity): พบว่าค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดเปอรโฟราติก กับค่า peak area มีความเป็นเส้นตรง ดังสมการ $y = 56921x + 73600$ ($r^2 = 0.9997$) ในช่วงความเข้มข้น 8.28 - 69.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 ความเที่ยง (precision): ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเปอรโฟราติกในสารสกัดได้เท่ากับ 1381.39 ± 19.14 mg% ในครีมพบ 32.52 ± 0.10 mg% การทดสอบความเที่ยงแสดงให้เห็นว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ $\leq 2.0\%$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (Table 2)

3.4 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ (limit of detection: LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้โดยมีความแม่นยำและความเที่ยง (limit of

quantification: LOQ): ค่า LOD ของการวิเคราะห์กรดเปอรโฟราติกเท่ากับ 0.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.71% ($n = 6$)

3.5 ความถูกต้อง (accuracy): โดยวิธีการเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80, 100 และ 120 ลงในสารละลายตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าค่า % recovery อยู่ในช่วง 98.0 - 102.0% ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐาน ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทั้งหมดแสดงใน Table 3 ผลการตรวจสอบทั้งหมดแสดงว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเปอรโฟราติกในสารสกัดยาห้ารากและครีมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Table 2 Results of repeatability (precision)

Parameters	% RSD (n = 6)	
	Extract	Cream
Injection precision	1.72	1.72
Intraday precision	1.38	0.29
Interday precision	1.83	1.12

Table 3 Recovery study (accuracy)

Spike Level (%)	Sample	% Recovery	% RSD (n = 6)
80	Extract	98.99 ± 0.57	0.58
	Cream	99.37 ± 1.36	1.37
100	Extract	99.73 ± 1.56	1.57
	Cream	99.56 ± 0.95	0.96
120	Extract	99.76 ± 1.72	1.72
	Cream	98.46 ± 0.46	0.47

4. การพัฒนาสูตรครีม

ผลการตรวจลักษณะทางกายภาพและผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดเปอรโฟราติก ความหนืด

และ pH ของสูตรครีมยาห้าารากทั้ง 3 สูตร แสดงใน Table 4

Table 4 Results of physical and chemical property analysis of the three cream formulations

Formula	Test parameters			
	Appearance	Viscosity (cPs) $\pm$ SD	pH $\pm$ SD	Assay of Perforatic acid (mg%) $\pm$ SD
1	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent with thick texture	91,289 $\pm$ 916	4.58 $\pm$ 0.04	26.30 $\pm$ 0.13
2	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	66,853 $\pm$ 3015	4.71 $\pm$ 0.03	30.94 $\pm$ 0.38
3	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	65,848 $\pm$ 2,463	4.93 $\pm$ 0.03	32.52 $\pm$ 0.10

5. การศึกษาความคงสภาพของตำรับครีมยาสูตรที่ 3

ผลการศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและเคมีของตำรับครีมเมื่อเก็บในอุณหภูมิห้องและสภาพเร่ง ในระยะเวลา 6 เดือน แสดงใน Table 5 ผลการประเมินอายุการเก็บรักษาผ่านการคำนวณจาก

สมการ Arrhenius equation พบว่ามีอายุได้นาน 25 เดือน สอดคล้องกับผลการทดสอบความคงตัวภายใต้สภาวะเร่งในช่วงระยะเวลา 6 เดือน โดยพบว่ากรดเปอรโฟราติกลดลงไม่เกิน 5% ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถสนับสนุนการกำหนดอายุการเก็บรักษาที่ 2 ปี^[28]

Table 5 Stability of cream formula 3

Days	Storage condition	Test parameters			
		Appearance	Viscosity (cPs) $\pm$ SD	pH $\pm$ SD	Assay of Perforatic acid (mg%) $\pm$ SD
0	RT*	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	65,848 $\pm$ 2,463	4.93 $\pm$ 0.03	32.52 $\pm$ 0.10
30	AT**	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	65,248 $\pm$ 1,957	5.10 $\pm$ 0.04	31.89 $\pm$ 0.18
90	RT*	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	64,064 $\pm$ 2,658	5.12 $\pm$ 0.03	32.13 $\pm$ 0.38
180	RT*	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	63,225 $\pm$ 2,714	5.24 $\pm$ 0.05	32.13 $\pm$ 0.42
90	AT**	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	74,621 $\pm$ 2,135	5.24 $\pm$ 0.04	31.86 $\pm$ 0.18
180	AT**	Homogeneous, white-ivory, mild herbal scent	75,308 $\pm$ 2,759	5.40 $\pm$ 0.05	31.86 $\pm$ 0.14

Note : * = Room Temperature (30 $\pm$ 2 °C/ without controlled relative humidity)

** = Accelerated test (40 $\pm$ 2 °C/75 $\pm$ 5 %RH)

อภิปรายผล

วิธีการเตรียมสารสกัดของงานวิจัยนี้อ้างอิงจาก ภูมิปัญญาการปรุงยาหม้อของแพทย์แผนไทย โดยใช้ วิธีต้มสกัดด้วยน้ำตามแนวทางดั้งเดิม และนำสารสกัด ที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยน้ำ ออกโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งเป็นเทคนิคที่ นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากกระบวนการทำ แห้งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และแกนกลางของอนุภาค มักจะมีอุณหภูมิต่ำกว่า 100°C จึงช่วยลดการเสื่อม สลายของผลิตภัณฑ์จากความร้อนได้^[29]

งานวิจัยยังได้พัฒนาและประเมินวิธีวิเคราะห์ กรดเปอร์โพรดิกโดยใช้เทคนิค RP-HPLC ซึ่งกรด เปอร์โพรดิกเป็นสารที่พบในรากคนทา พืชของสาร มีขนาดใหญ่ที่สุดในโครมาโทแกรมของสารสกัด วิธี วิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นผ่านการตรวจสอบความเหมาะสมตามแนวทาง ICH Q2(R1) ทั้งในด้านความถูกต้อง (accuracy), ความแม่นยำ (precision), ความจำเพาะ (specificity), ความเป็นเชิงเส้น (linearity) และขีด จำกัดการตรวจวัด (LOD/LOQ) ส่งผลให้สามารถใช้วิธีนี้ในการควบคุมคุณภาพของทั้งสารสกัดและ ผลิตภัณฑ์ครีมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การเลือกใช้สารสกัดแห้งตำรายาห้ารากในความ เข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักสำหรับการพัฒนาครีม ทาภายนอกในงานวิจัยนี้พิจารณาโดยอิงจากงานวิจัย ที่พบว่าครีมสมุนไพรที่มีความเข้มข้นในช่วง 1-5% w/w ให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ชัดเจน มีความคงตัว และปลอดภัยต่อผิวหนัง เช่น ครีมจาก *Phyllanthus amarus* และ *Tuberose* ที่มีความเข้มข้น 2.5-5% w/w ให้ผลต้านเชื้อและลดการอักเสบได้ดี^[30-32]

ในการพัฒนาสูตรครีมยาทั้ง 3 สูตร จากการ ศึกษาลักษณะทางเคมีกายภาพของครีมทั้ง 3 สูตร

พบว่าสูตรที่ 1 มีเนื้อหนักและความหนืดสูงวัดได้เท่ากับ $91,289 \pm 916$ cP และมีค่า pH เท่ากับ 4.58 ± 0.04 ซึ่งค่อนข้างต่ำ ความหนืดของสูตรนี้ค่อนข้างสูงเกินไป ซึ่งทำให้รู้สึกเหนอะหนะเมื่อทาลงบนผิวหนัง ซึ่งอาจ ลดความพึงพอใจในการใช้ผลิตภัณฑ์ของผู้ใช้ เมื่อประเมินจากสูตรตำรับคาดว่า cetareth-25 ทำให้ เนื้อครีมข้น และ stearyl alcohol ที่สูงถึงร้อยละ 7 มีผลให้ครีมมีความหนืดสูง เพื่อลดความข้นหนืด ของครีมจึงปรับเป็นสูตรที่ 2 โดยเปลี่ยน emulsifier จาก cetareth-25 มาเป็น Lexemul[®] 561 และลด ปริมาณของ stearyl alcohol เป็นร้อยละ 5 ทำให้ได้ เนื้อครีมที่เบาขึ้น และเพิ่มปริมาณของ liquid paraffin จากร้อยละ 4 เป็นร้อยละ 6 เพื่อให้ครีมมีความ สลื่นง่าย พบว่าได้ความหนืดลดลง เท่ากับ $66,853 \pm 3015$ cP และค่า pH เท่ากับ 4.71 ± 0.03 ครีมสูตรที่ 3 ลดปริมาณของ stearyl alcohol เป็นร้อยละ 4 และ เพิ่ม liquid paraffin เป็นร้อยละ 6.5 เพื่อเพิ่มความ นุ่มลื่น พบว่าลดความหนืดได้เป็น $65,848 \pm 2463$ cP และค่า pH เท่ากับ 4.93 ± 0.03

ครีมสูตรที่ 3 ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในด้าน คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เนื้อครีมมีลักษณะ เนียนละเอียด สีส้มอ่อน ไม่เกิดการแยกชั้น และ มีกลิ่นสมุนไพรอ่อน ๆ นอกจากนี้ เนื้อครีมยังมีความ เป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับสภาพผิว โดยผล การวิเคราะห์พบว่าปริมาณกรดเปอร์โพรดิก ในตำรับครีมอยู่ที่ 32.52 มิลลิกรัมต่อครีม 100 กรัม ซึ่งสอดคล้องกับการเตรียมสูตรโดยใช้สารสกัดที่มี ปริมาณกรดเปอร์โพรดิกร้อยละ 1.38 โดยน้ำหนัก ดังนั้น สูตรที่ 3 จึงมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี ที่เหมาะสมกับการนำไปศึกษาความคงตัวต่อไป

ผลการตรวจสอบลักษณะภายนอก ตลอดช่วง

เวลา 180 วัน ในทั้งสองกลุ่มอุณหภูมิต่ำ ด้านลักษณะภายนอก ครีมยังคงเป็นเนื้อเดียวกันไม่เปลี่ยนแปลง ไม่มีการแยกชั้น สีเปลี่ยน หรือกลิ่นผิดปกติ บ่งชี้ถึง ครีมมีความคงตัวทางกายภาพดี ด้านความหนืด ครีมเก็บที่อุณหภูมิห้อง มีความหนืดลดลงเล็กน้อย จาก $65,848 \pm 2,463$ cP ในวันแรก (Day 0) เหลือ $63,225 \pm 2,714$ cP ในวันที่ 180 คิดเป็นการเปลี่ยนแปลงประมาณ 3.98% ซึ่งยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ที่สภาวะเร่ง ครีมมีความหนืดเพิ่มขึ้นเป็น $75,308$ cP คิดเป็นเพิ่มขึ้นประมาณ 14% อาจเกิดจากการระเหยของน้ำบางส่วนหรือการจับตัวของ emulsifier ทำให้ครีมข้นขึ้นเล็กน้อยแต่ยังคงเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกชั้นของเนื้อครีม ถือว่าไม่มีผลเสียต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสูตรครีมดังกล่าวมีความคงตัวด้านความหนืดในช่วงระยะเวลาทดสอบที่กำหนด ด้านค่า pH มีทิศทางการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นแต่ยังคงอยู่ในระดับที่สามารถใช้กับผิวได้โดยไม่ทำให้เกิดปัญหา อย่างไรก็ตามควรเฝ้าระวังการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระยะยาว ด้านปริมาณกรดเปอร์โฟราติก ยังคงมีความคงตัวสูงตลอดช่วงเวลา 180 วัน ทั้งในสภาวะอุณหภูมิต่ำและสภาวะเร่ง โดยค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง $31.86-32.52$ mg% ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 2.1% จากค่าเริ่มต้น การเปลี่ยนแปลงในระดับนี้ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานความคงตัวของสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งโดยทั่วไปหากปริมาณสารสำคัญคงเหลือไม่น้อยกว่า 95% ของค่าเริ่มต้นจะถือว่าสารมีความคงตัวเพียงพอ จากผลการศึกษา จึงสามารถสรุปได้ว่ากรดเปอร์โฟราติกมีความเสถียรดีในสูตรครีมที่ทดสอบ และไม่มีการสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญภายใต้เงื่อนไขการเก็บรักษา

ที่ใช้ในการทดสอบ เพราะปริมาณสารบ่งชี้คุณภาพยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานค่าที่กำหนดสำหรับการเสื่อมสภาพ^[28]

ข้อสรุป

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมจากสารสกัดยาห้าราก โดยผสมผสานภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยเข้ากับเทคโนโลยีสมัยใหม่ สารสกัดยาห้ารากได้จากกระบวนการต้มด้วยน้ำตามแนวทางดั้งเดิม โดยมีอัตราส่วนสมุนไพรต่อน้ำหนักสารสกัดแห้งที่ 7.3:1 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดเปอร์โฟราติกในผลิตภัณฑ์พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค RP-HPLC ซึ่งผ่านการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน ICH Q2(R1) ทุกพารามิเตอร์อย่างครบถ้วน แสดงความเป็นเส้นตรงดีในช่วงความเข้มข้น 8.28-69.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($R^2 = 0.9997$) ค่าร้อยละการคืนกลับในช่วง 98.0-102.0% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 2%

จากการพัฒนาสูตรครีมจำนวน 3 สูตรพบว่าสูตรที่ 3 ซึ่งมีสารสกัดยาห้ารากในความเข้มข้น 2.5% โดยน้ำหนัก มีลักษณะทางกายภาพเหมาะสมที่สุด ได้แก่ เนื้อครีมเนียนละเอียด ไม่แยกชั้น กลิ่นสมุนไพรอ่อน และให้สัมผัสที่ดีต่อผิว ความหนืด $65,848 \pm 2,463$ cP และ pH 4.93 ± 0.03 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับผิวหนัง ครีมที่ได้มีปริมาณกรดเปอร์โฟราติก 32.52 มิลลิกรัม/100 กรัม และผ่านเกณฑ์คุณภาพตามข้อกำหนดของตำรายาแผนไทย

การศึกษาความคงตัวเป็นเวลา 6 เดือน ทั้งในสภาวะอุณหภูมิต่ำและสภาวะเร่ง พบว่าครีมมีความคงตัวดีเยี่ยม ลักษณะทางกายภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลง ความหนืดเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 14%

และปริมาณกรดเปอร์โฟราติกยังคงเสถียร โดยมีการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 2.1% จากค่าเริ่มต้น สามารถประมาณอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์ได้อย่างน้อย 25 เดือน

ผลจากการศึกษานี้ถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นอันสำคัญสำหรับการพัฒนาครีมจากสารสกัดยาห้ารากลที่มีลักษณะเป็นนวัตกรรม นำเอาตำรับสมุนไพรไทยมาสร้างคุณค่าและศักยภาพเชิงผลิตภัณฑ์อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาระสิทธิภาพและความปลอดภัยทางคลินิกเพิ่มเติม เพื่อกำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัด ด้วยการใช้กรดเปอร์โฟราติกเป็นสารมาตรฐาน ถือเป็นการยกระดับคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยให้ได้มาตรฐานตามพระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562 และสามารถตอบสนองความต้องการผู้บริโภคในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เครื่องมือและอุปกรณ์ ในการทำวิจัยในครั้งนี้

References

1. Busaba P, editor. Paetthayasat songkhro: Medical wisdom and Literary heritage of the nation. 2nd ed. Bangkok: Kurusapa Ladprao Press; 2004. (in Thai)
2. Nattarada B. Traditional Thai medicine and building immunity against viruses. Chonburi Hospital Journal. 2020;45(3):229-40. (in Thai)
3. Juckmeta T, Itharat A. Anti-inflammatory and antioxidant activities of Thai traditional remedy called "Ya Ha Rak." J Health Res. 2012;26(4):205-10.
4. Booranasubkajorn S, Kanlaya H, Huabprasert S, Lumlerdkij N, Akarasereenont P, Tripatara P. The effect of Thai herbal Ha-Rak formula (HRF) on LPS-induced systemic inflammation in Wistar rats. Siriraj Med J. 2017;69(6):356-62.
5. Palo T, Thaworn A, Charoenkij P, Thamsermsang O, Chotewuttakorn S, Tripatara P, Laohapand T, Akarasereenont P. The effects of Thai herbal Ha-Rak formula on COX isoform expression in human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β . Evid Based Complement Alternat Med. 2017;2017:9383272. doi:10.1155/2017/9383272. PubMed PMID: 29234444
6. Juckmeta T, Pipatattanaseree W, Jaidee W, Dechayont B, Chunthong-Orn J, Andersen RJ, Itharat A. Cytotoxicity to five cancer cell lines of the respiratory tract system and anti-inflammatory activity of Thai traditional remedy. Nat Prod Commun. 2019;14(5). doi:10.1177/1934578X19845815
7. Kwanhian W, Bunluephit K. Cytotoxicity, anti-inflammatory, and antioxidant activities of water extracts of Thai traditional Ha-Rak remedy. Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University. 2018;37:27-38. (in Thai)
8. Hongsiri A, Duanyai A, Kaewnoi A. Antioxidant activities, total phenolic content, and total flavonoid content of extracts from *Alpinia galanga*, *Gloriosa superba*, and Ha-Rak remedy. Journal of Science Progress in the World. 2021;21(2):171-80. (in Thai)
9. Kongtaphan K. Antioxidant effect of "Ayurved Siriraj Ha-Rak formula" extract and caffeic acid on melanogenesis induced by UVA in melanoma cell line (Master's thesis). Bangkok: Mahidol University; 2010.
10. Singharachai C, Palanuvej C, Kiyohara H, Yamada H, Ruangrunsi N. Safety evaluation of Thai traditional medicine remedy: Ben-cha-lo-ka-wi-chian. J Health Res. 2011;25(2):83-90.
11. Itharat A, Reuangnoo S, Panthong S, Sangrapee C, Khantham S, Chatsuwan J, Sinsomboon A. Antimicrobial and cytotoxic activities of five Thai plants used as antipyretic drug. Planta Med. 2010;76(12):1215-19.
12. Nuaeissara S, Kondo S, Itharat A. Antimicrobial activity of the extracts from Benchalokawichian remedy and its components. J Med Assoc Thai. 2011;94(7):172-7
13. Juckmeta T, Thongdeeying P, Itharat A. Inhibitory effect on β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells of extracts and some pure constituents of Benchalokawichian, a Thai herbal remedy, used for allergic disorders. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:828760. doi:10.1155/2014/828760. PubMed PMID: 25580152
14. Somsak Nualkaew, editor. Guidelines for diagnosis and treatment of diseases using applied Thai traditional

- medicine. 2nd ed. Bangkok: Usakaphim; 2014. (in Thai)
15. Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C.L. and Xu, H., 2008. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*, 3(1), p.7.
 16. Srichaipor N, Pongcharoen P, Kanokkangsadal P, Itharat A. Skin irritation and allergic testing of Thai herbal extracts (Ha-Rak with turmeric) in healthy volunteers. *Thammasat Med J*. 2020;20(2):165-74.
 17. Suwannarat W, Achariyakul M, Itharat A, Kiettinun S. A clinical study phase I on safety of Thai medicinal formula "Benjalokawichien (Ha-Rak)" and each plant component extract. *Thammasat Med J*. 2012;12(4):767-76.
 18. Onkoksoong T, Jeayeng S, Pongvarin N, Limsaengurai S, Thamsermsang O, Tripatara P, Panich U. Thai herbal antipyretic 22 formula (APF22) inhibits UVA-mediated melanogenesis through activation of Nrf2-regulated antioxidant defense. *Phytother Res*. 2018;32(8):1546-54.
 19. Lohakul J, Chaiprasongsuk A, Jeayeng S, Saelim M, Muanjumpon P, Thanachaiphiwat S, Tripatara P, Soontrapa K, Lumlerdkij N, Akarasereenont P, Panich U. The protective effect of polyherbal formulation, Harak formula, on UVA-induced photoaging of human dermal fibroblasts and mouse skin via promoting Nrf2-regulated antioxidant defense. *Front Pharmacol*. 2021;12:649820. doi:10.3389/fphar.2021.649820. PubMed PMID: 33912060
 20. Pluemsamran T, Tripatara P, Phadungrakwittaya R, Akarasereenont P, Laohapand T, Panich U. Redox mechanisms of AVS022, an oriental polyherbal formula, and its component herbs in protection against induction of matrix metalloproteinase-1 in UVA-irradiated keratinocyte HaCaT cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:739473. doi:10.1155/2013/739473. PubMed PMID: 24171043
 21. Jantarat C, Sirathanarun P, Chuchue T, Konpian A, Sukkua G, Wongprasert P. In vitro antimicrobial activity of gel containing the herbal ball extract against *Propionibacterium acnes*. *Sci Pharm*. 2018;86(8). doi:10.3390/scipharm86010008. PubMed PMID: 29495650
 22. Phumlek K, Itharat A, Saesiw U, Pipatrattanaseree W, Piwngam K, Sookdee P, Davies MN. Chemical and biological stability under forced degradation and accelerated storage conditions of the anti-acne formulation of Pra-Sa-Mang-Khud ethanolic extract. *Asian Med J Altern Med*. 2022;22(3):185-95.
 23. Chokewiwat V, Tantiwess S, Chamnianrungrak S, editors. *Thai Drug System* 2020. Bangkok: Thana Aroon Printing Co., Ltd.; 2021. (in Thai)
 24. Sarapanchotivitaya O. Research and Development of Herbal Medicine: Immunostimulatory and Anti-inflammatory Herbs. Phitsanulok: Naresuan University Press; 2019. (in Thai)
 25. Srivastava A, Pandey S, Singh A, Siddiqui A, Pandey N. Cream: A topical drug delivery system (TDDS). *Eur J Pharm Med Res*. 2021;8(1):340-2.
 26. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals or Human Use (ICH). ICH harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [Internet]. 2005 Nov [cited 2024 Jan 2]; [17 screens]. Available from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
 27. AOAC International. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements [Internet]. Gaithersburg (MD): AOAC International; 2016 [cited 2025 Apr 19]; [18 screens]. Available from: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf
 28. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [Internet]. 2005 Nov [cited 2024 Jan 2]; [17 screens]. Available from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
 29. Fang, Z. and Bhandari, B., 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food chemistry*, 129(3), pp.1139-1147.
 30. Saraf, S., Chhabra, S., Kaur, C.D. and Saraf, S., 2012. Development of photochemoprotective herbs containing cosmetic formulations for improving skin properties. *Journal of Cosmetic Science*, 63(2), pp.119-131
 31. Ajala TO, Femi-Oyewo MN, Odeku OA, Aina OO, Saba AB, Oridupa OO. The physicochemical, safety and antimicrobial properties of *Phyllanthus amarus* herbal cream and ointment. *J Pharm Investig*. 2016;46(2):169-78.
 32. Ghosh PK, Bhattacharjee P, Das S. Antimicrobial cream formulated with supercritical carbon dioxide extract of tuberose flowers arrests growth of *Staphylococcus aureus*. *Recent Pat Biotechnol*. 2016;10(1):86-102.