

การพัฒนาและประเมินผลของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งสำหรับต้านเชื้อรา เพื่อการรักษาโรคกลาก

ปฐมพร ปริกษาร^{*†}, ฉัตรภรณ์ ใจมา^{*}, วิรัตน์ สุเมธวิวัฒนกุล[†], วริฏฐา สงวนเรือง[†], ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ^{*},
รินทร์ลภัส อรรถเอียรไชย[†], นันทวรรณ เมฆา[†], นวชนิษฐ์ สัจจานนท์[†], ปณิดดา เทพอัศร^{*}

^{*}สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

[†]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

[‡]ผู้รับผิดชอบบทความ: patamaporn.p@dmasc.mail.go.th

บทคัดย่อ

ทองพันชั่ง [*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz] เป็นสมุนไพรที่ใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านของไทยสำหรับรักษาโรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน และผื่นคัน พืชนี้มีประสิทธิภาพดีในการต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของโรคผิวหนังจากเชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนจากรากทองพันชั่ง การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อการพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อราจากรากทองพันชั่ง ที่ผ่านกระบวนการวิเคราะห์คุณภาพ ทดสอบประสิทธิภาพ และทดสอบความปลอดภัยของตำรับ การพัฒนาสูตรตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งโดยใช้สารก่อเจลเป็นโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ให้ลักษณะทางกายภาพของตำรับเหมาะสมตามที่ต้องการ โดยตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% Rhinacanthin C) ที่เตรียมได้มีปริมาณสารสำคัญไรนาแคนทิน ซี เป็นไปตามกำหนด (90.0-110.0% ของปริมาณที่ระบุในฉลาก) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราในระดับหลอดทดลองพบว่าตำรับสามารถต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ได้ดี การทดสอบการระคายเคืองและการทดสอบการแพ้ทางผิวหนังของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง ตามมาตรฐาน ISO 10933-10 พบว่าตำรับไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายและไม่ก่อให้เกิดการแพ้ในหนูตะเภา อย่างไรก็ตาม การทดสอบประสิทธิภาพของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในระดับสัตว์ทดลองโดยการทาบริเวณรอยโรควันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน พบว่าตำรับสามารถลดอัตราการติดเชื้อของหนูตะเภาได้ 59.55% ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อกำหนดขนาดใช้ที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง แล้วจึงนำตำรับไปศึกษาในระดับคลินิกเพื่อประเมินความปลอดภัยและประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: ทองพันชั่ง, ด้านเชื้อรา, เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง, ไรนาแคนทิน ซี, เดอร์มาโตไฟต์

Development and Evaluation of *Rhinacanthus nasutus* Root Extract Gel as an Antifungal for the Treatment of Dermatophytosis

Patamaporn Pruksakorn^{*‡}, Chatraporn Jaima^{*}, Virat Sumateewatanakul[†], Waridtha Sa-nguanruang[†], Parnuphan Panyajai^{*}, Rinrapas Autthateinchai[†], Nanthawan Mekha[†], Navakanit Sachanonta[†], Panadda Dhepakson^{*}

^{*}Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat-kwan Sub-District, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

[†]National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat-kwan Sub-District, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

[‡]Corresponding author: patamaporn.p@dmisc.mail.go.th

Abstract

Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz,, or *thong-phan-chang* in Thai, has been used in Thai folk medicine for the treatment of skin diseases, especially ringworm, tinea versicolor and eczema. This plant, particularly its roots, exhibits a potent antifungal activity against dermatophytes. This study aimed to develop a topical antifungal formulation from *R. nasutus* roots which underwent the quality analysis, efficacy testing, and safety testing. Gel preparation that was developed using sodium carboxymethyl cellulose achieved the proper characteristics. The prepared *R. nasutus* root extract gel contained (0.10% rhinacanthin C) contained rhinacanthin C as an active ingredient within the specified concentration (90.0-110.0% labeled amount). Regarding efficacy, the gel preparation exhibited an *in vitro* antifungal activity against dermatophytes. The results of skin irritation and skin sensitization tests according to ISO10993-10 indicated that the gel preparation did not cause skin irritation on rabbits nor skin sensitization in guinea pigs. However, an *in vivo* efficacy study by once-daily application of the gel preparation for 14 consecutive days revealed that the fungal infection rate in guinea pigs dropped to 59.55%. Therefore, the *R. nasutus* root extract gel should be further investigated for its appropriate dosage and administration before evaluating its safety and efficacy in a clinical trial.

Key words: *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz, antifungal, *R. nasutus* root extract gel, rhinacanthin C, dermatophytes

บทนำและวัตถุประสงค์

ทองพันชั่ง [*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz] เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีชื่อท้องถิ่นที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เช่น ทองคันทั่ง และหญ้ามันไก่ พืชนี้เจริญเติบโตได้ในภูมิภาคเอเชียที่มีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสารหลายกลุ่มเป็นองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ terpenoids, flavonoids, glycosides,

sterols, benzenoids, anthraquinones และ naphthoquinones^[1] รวมถึงมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ต้านเชื้อแบคทีเรีย^[2-3] ต้านเชื้อรา^[4-5] ต้านไวรัส^[6-7] บรรเทาปวด^[8] ต้านการอักเสบ^[8-9] และต้านการแพ้^[10] โดยกลุ่มสารในทองพันชั่งที่แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ เป็นสารในกลุ่ม naphthoquinones ซึ่งมีสารออกฤทธิ์หลักคือ ไรนาแคนทิน ซึ่^[2-10]

ตามตำรายาไทยของพืชมังใช้สำหรับรักษาโรคผิวหนัง กลาก เกื้อน และผื่นคัน โดยใช้ใบสดและราก ตำให้ละเอียดแช่ในเหล้าโรง แล้วนำตัวยาที่ได้มาใช้ทาบริเวณที่มีอาการวันละ 2-3 ครั้ง จนกว่าจะหาย^[11-12] ซึ่งจะเห็นได้ว่าการนำสมุนไพรนี้มาใช้รักษาโรคตามวิธีการดั้งเดิม ไม่สะดวกต่อการนำไปใช้จริงในชีวิตประจำวัน

สารสกัดของพืชมังมีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ได้แก่ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Malassezia furfur* และ *Malassezia globosa*^[5, 13-15] โดยพบว่าสารสกัดใบพืชมังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (fungistatic activity) กลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ ได้แก่ *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* และ *M. gypseum* ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal activity) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูงกว่าค่า MIC โดยสารสกัดใบพืชมังมีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อเดอร์มาโตไฟต์ ทำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์ รูปร่างของเซลล์ผิดปกติ และยุบตัวลง ส่งผลให้เกิดเซลล์ตาย^[13] จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดของพืชมังมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา กลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคกลาก และต้านเชื้อ *Malassezia* sp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเกื้อน รวมถึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อราที่ผิวหนัง (cutaneous fungal infections) ชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *A. niger*, *P. chrysogenum*, *C.*

albicans และ *C. tropicalis* ซึ่งฤทธิ์ต้านเชื้อราดังกล่าวนี้สอดคล้องกับสรรพคุณของพืชมังซึ่งในการรักษาโรคผิวหนัง กลาก และเกื้อน ตามตำราแพทย์แผนโบราณของไทย^[11-12]

ปัจจุบันมีการนำพืชมังมาทำเป็นยาในรูปแบบ “ยาทิงเจอร์พืชมัง” ซึ่งยานี้ได้บรรจุอยู่ในบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ โดยมีข้อบ่งใช้เป็นยาทาแก้กลาก เกื้อน โรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา และน้ำกัดเท้า อย่างไรก็ตาม ตำรับยาดังกล่าวไม่มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ ระบุเพียงมีตัวยาสสำคัญเป็นสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ (70%) ของใบพืชมังสด ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)^[16] ซึ่งการไม่กำหนดปริมาณสารสำคัญอาจทำให้การผลิตยาแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่คงที่ และมีผลต่อประสิทธิผลของยาในการรักษาโรค นอกจากนี้ยาในรูปแบบทิงเจอร์จะมีปริมาณแอลกอฮอล์ในตำรับสูง จึงมักก่อให้เกิดการระคายเคืองในบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน ผิวหนังที่มีบาดแผลหรือมีแผลเปิด และการใช้สารสกัดจากใบพืชมังสดทำให้มีสารสีเขียวของคลอโรฟิลล์ปนอยู่ในตำรับ ซึ่งสารสีดังกล่าวนี้เมื่อเนื้อสัมผัสได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรต้านเชื้อราจากพืชมัง โดยเลือกใช้สารสกัดจากส่วนรากพืชมังซึ่งมีปริมาณสารสำคัญไทรนาคเนทิน ซี สูงกว่าส่วนอื่นของพืชมาเป็นส่วนประกอบในตำรับ^[5] พัฒนารูปแบบให้อยู่ในรูปแบบเจลที่มีปริมาณสารสำคัญเหมาะสม มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา ไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากพืชมังที่ได้มีปริมาณสารสำคัญกำหนดชัดเจน มีปริมาณแอลกอฮอล์ในตำรับลดลง และไม่มีสารสีเขียวของคลอโรฟิลล์ปนอยู่ในตำรับ

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 สารเคมี

Carbopol 940 (Lubrizol Southeast Asia (PTE) LTD), carboxymethylcellulose sodium salt, low viscosity (Na CMC) (Merck), methylcellulose (MC) (Sigma), hydroxyethylcellulose (HEC) (Merck), Poloxamer 188 (Merck), EDTA (Univar), hydrogenated castor oil (Sigma), PEG 400 (Fluka), glycerin (Fisher), propylene glycol (Unilab), methyl paraben (Sigma Aldrich), propyl paraben (Sigma-Aldrich), ethanol (Merck), triethanolamine (Ajax Finechem), citric acid monohydrate (Merck), tri-sodium citrate dihydrate (Merck), และ trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich) ใช้สารเคมีชนิด analytical grade; acetonitrile (J.T. Baker), และ methanol (J.T. Baker) ใช้ตัวทำละลายชนิด HPLC grade

1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

HPLC-PDA (Agilent Infinity II 1260 HPLC, Agilent Technologies), เครื่องชั่งดิจิทัล ความละเอียดทศนิยม 7 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น XP2U), เครื่องชั่งดิจิทัล ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius), เครื่องชั่งดิจิทัล ความละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS 1003TS), 100 color-fixed indicator strips (MACHEREY-NAGEL), เครื่องวัดความหนืด (Myr รุ่น VP1000)

1.3 ตัวอย่างพืช

รากทองพันชั่งเก็บจากต้นทองพันชั่งที่มีอายุมากกว่า 1 ปี จากอำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี ใน

เดือนกุมภาพันธ์ 2559 ตรวจระบุชื่อชนิดพันธุ์พืช และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ่างอิงเพื่องานวิจัย (Herbarium no. BKF 194241) ที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร

1.4 การเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่ง

รากทองพันชั่งสดนำมาล้างเพื่อกำจัดเศษดินที่ติดรากด้วยน้ำสะอาด และคัดแยกสิ่งปนเปื้อนออกจากนั้นนำมาผึ่งในที่ที่แห้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและบดให้มีขนาดเล็กกว่า 2 มิลลิเมตรหรือสามารถผ่านร่อนขนาด 10 mesh ได้ นำผงรากแห้งไปหมักด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1 กรัมของสมุนไพรแห้งต่อเอทานอล 20 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลามากกว่า 16 ชั่วโมง และสกัดต่อด้วยคลีนอัลตราโซนิก 15 นาที โดยทำการสกัดตามขั้นตอนข้างต้นซ้ำ 2 ครั้ง กรองและนำส่วนเอทานอลไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบของรากทองพันชั่ง จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดแยกต่อด้วยน้ำกับเอทิลเอซีเทต นำสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทตไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดรากทองพันชั่งแห้ง เก็บรักษาตัวอย่างสารสกัดในโถแก้วดูดความชื้น (desiccator) จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ สำหรับนำไปใช้วิเคราะห์การปนเปื้อนจากโลหะหนักที่มีพิษหาปริมาณสารไรนาแคนทินซี และพัฒนาตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

2. วิธีการศึกษา

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่ง

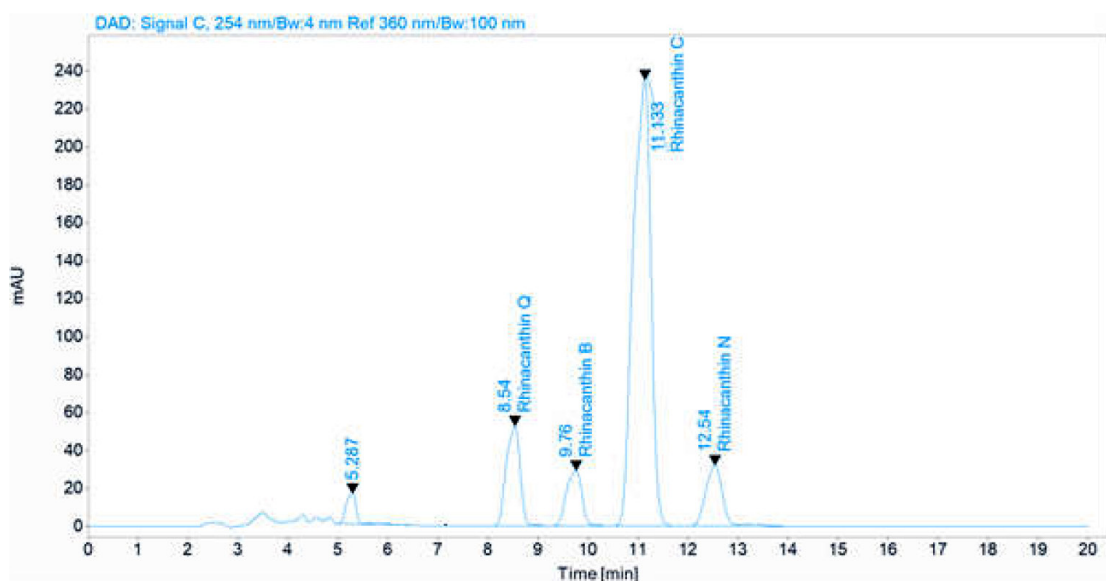
การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยวิธี RP-HPLC ใช้เครื่อง HPLC-PDA โดยมีวัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ชนิด

รีเวอร์สเฟส (VertiSep™ UPS C18 HPLC COLUMN ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm. x ความยาว 250 mm ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน) มีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1% กรดไตรฟลูออโรแอซิดิกในแอซิโตไนไตรล์ และ 0.1% กรดไตรฟลูออโรแอซิดิกในน้ำ อัตราส่วน 75:25 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปริมาณสารไรนาแคนทินซี ในสารสกัดรากทองพันชั่ง วิเคราะห์โดยใช้สารละลายสารสกัดรากทองพันชั่งในเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร โดยวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดละ 3 ครั้ง และใช้พื้นที่ใต้พีคคำนวณปริมาณสารไรนาแคนทินซี จากสมการเส้นตรงของกราฟสารมาตรฐานไรนาแคนทินซี ที่มีความเข้มข้นในช่วงการวิเคราะห์ 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สารไรนาแคนทินซี มี retention time ที่ 11.1 นาที ดังภาพที่ 1)

2.2 การพัฒนาตำรับเจลพื้นและเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

ตำรับเจลพื้นแต่ละชนิดเตรียมโดยการนำสารก่อเจลโปรยลงในน้ำปริมาตรสองในสามส่วนของปริมาตรน้ำในตำรับโดยใช้วิธีการและน้ำที่มีอุณหภูมิเหมาะสมกับสารก่อเจลแต่ละชนิด จากนั้นเติม glycerine, polyethylene glycol 400, propylene glycol, paraben concentrate และ EDTA ที่ละลายในน้ำ แล้วผสมให้เข้ากัน นำ ethanol และ hydrogenated castor oil ผสมให้เข้ากันและใส่ลงในตำรับยาเตรียม เฉพาะตำรับที่ใช้สารก่อเจลเป็น Carbopol 940 เติม triethanolamine ตามปริมาณที่กำหนดเพิ่มลงไป คนส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำส่วนที่เหลือลงไปผสมแล้วคนต่อจนกระทั่งเจลพื้นผสมเข้ากัน ปริมาณของสารประกอบแต่ละชนิดที่ใช้ในตำรับ (ตารางที่ 1) นำเจลพื้นที่เตรียมได้ไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และ pH ของตำรับ

คัดเลือกสารก่อเจลที่ให้ลักษณะทางกายภาพ



ภาพที่ 1 HPLC fingerprint ของสารสกัดรากทองพันชั่ง

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของตำรับเจลพื้น

ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	สัดส่วนสารเคมีในตำรับ (%w/w)				
		1	2	3	4	5
carbopol 940	สารก่ोजล	1				
sodium carboxymethyl cellulose (Na CMC)	สารก่ोजล		5			
methylcellulose (MC)	สารก่ोजล			3		
hydroxyethylcellulose (HEC)	สารก่ोजล				2	
poloxamer 188	สารก่ोजล					15
glycerin	สารกันน้ำระเหย	8	8	8	8	8
PEG400	สารกันน้ำระเหย	16	16	16	16	16
propylene glycol	สารกันน้ำระเหย	5	5	5	5	5
EDTA	สารต้านออกซิเดชัน	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ethanol	ตัวทำละลาย	10	10	10	10	10
hydrogenated castor oil	ตัวทำละลาย	1	1	1	1	1
paraben concentrate	สารถนอม	1	1	1	1	1
triethanolamine	สารปรับความเป็นกรด-ด่าง	1.2	-	-	-	-
water qs to	น้ำกระสายยา	100	100	100	100	100

ของเจลพื้นดี คือ Carbopol 940 และ Na CMC นำมาเตรียมตำรับโดยปรับปริมาณความเข้มข้นของสารก่ोजลจนกระทั่งได้ลักษณะทางกายภาพและความหนืดของตำรับตามต้องการ ใช้สูตรตำรับดังกล่าวเตรียมเจลสารสกัดรากทองพันชั่งโดยนำสารสกัดรากทองพันชั่งมาละลายในเอทานอลและ hydrogenated castor oil เติมลงในตำรับยาเตรียม ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ใช้สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง โดยการหาปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในตำรับยาเตรียม ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และตรวจสอบการปนเปื้อนจากโลหะหนักในตำรับ

2.3 การศึกษาความคงตัว

การประเมินความคงตัวเบื้องต้นของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งโดยเก็บรักษาตำรับเจลที่

อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน แล้วตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ความหนืด และค่า pH ของตำรับ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โดยชั่งเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง น้ำหนัก 1 กรัม นำไปละลายในเอทานอลให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask แล้วเติมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมากรองผ่าน 0.45 μm nylon filter การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดจะผสมสารละลายที่เตรียมข้างต้นกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วบรรจุใส่ขวดสำหรับ

ฉีด HPLC นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารไธนาเคนทิน ซึ่งในตำรับสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยวิธี RP-HPLC ใช้วัฏภาคคงที่ (stationary phase) เป็นคอลัมน์ VertiSep UPS C₁₈ HPLC column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. x ความยาว 250 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย 0.1% กรดไตรฟลูออโรแอซิดิกในแอซิโตไนไตรล์ (สารละลาย ก) และ 0.1% กรดไตรฟลูออโรแอซิดิกในน้ำ (สารละลาย ข) ในอัตราส่วน 72:28 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ตัวอย่างของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมได้ตามวิธีข้างต้นปริมาตร 50 ไมโครลิตรสำหรับการวิเคราะห์ และใช้พื้นที่ใต้พีคคำนวณปริมาณสารไธนาเคนทิน ซึ่งจากผลการเส้นตรงของกราฟสารมาตรฐานไธนาเคนทิน ซึ่งมีความเข้มข้น 10, 40, 70, 100, 130 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในระดับหลอดทดลอง

2.5.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อราสำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกอบด้วย *Trichophyton rubrum* DMST 30236, *Trichophyton mentagrophytes* DMST 19735, *Microsporum gypseum* DMST 21146, และ *Microsporum canis* 13-60-04317 โดยทำการเพาะเลี้ยงบน Sabouraud dextrose agar slants และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยนอาหารใหม่อย่างน้อยทุก 2 สัปดาห์ การเตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบทำโดยเจือจางเชื้อแต่ละชนิดใน 0.85% sodium chloride (NaCl) เพื่อให้มีความ

เข้มข้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรเท่ากับ 1 McFarland standard ซึ่งจะมีความหนาแน่นของเชื้อ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลายเชื้อราที่เตรียมได้สำหรับศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในระดับหลอดทดลอง

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ 3 วิธี ดังนี้

1) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion^[17-18]

การทดสอบใช้อาหารแข็งชนิด Sabouraud dextrose agar ใน plastic petri dishes (90 mm DIA) นำมาเจาะรูลงบนอาหารแข็งตรงกลางจาน 1 หลุม โดยใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จากนั้นทำการ spread เชื้อราสำหรับทดสอบลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงด้วย sterile cotton swab แล้วใส่เจลสารสกัดรากทองพันชั่งหรือเจลพื้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุม นำจานเพาะเชื้อไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 3-5 วัน และอ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นด้วย vernier caliper

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยใช้เทคนิค soft-agar overlay

การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Hockett KL และ Baltrus DA^[19] โดยใช้อาหารแข็งชนิด Sabouraud dextrose agar ใน plastic petri dishes (90 mm DIA) เป็น bottom agar และเตรียม Sabouraud dextrose agar ที่มีส่วนประกอบของ agar ปริมาณ 1.5% นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขณะที่อาหารยังเหลว (soft agar) ใช้ sterile serological pipet ตูดอาหารปริมาตร 15 มิลลิลิตรใส่ลงใน sterile culture

tube แล้วปล่อยให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมน้ำเชื้อเดอร์มาโตไฟต์ที่เตรียมสำหรับทดสอบปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงในอาหารเหลวอุ่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วเทอาหารเหลวที่ผสมกับเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบน bottom agar เอียงจานเพาะเลี้ยงไปมาทุกด้านเพื่อให้ soft agar คลุมทั่วบริเวณหน้า bottom agar (คิดเป็นพื้นที่ประมาณ 57 ตารางเซนติเมตร) และทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวประมาณ 15-20 นาที ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยใช้เจลสารสกัดรากทองพันชั่งหรือเจลพื้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำมา spread ลงบนจานเพาะเลี้ยงโดยใช้ glass spreader บนผิวหน้าของอาหารแข็งแห้ง จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน และประเมินผลการทดสอบเปรียบเทียบกับจานเพาะเลี้ยงที่ไม่ใส่สารทดสอบ (non-treated)

3) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยใช้เทคนิค over-agar antibiotic plating

การทดสอบใช้เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ปริมาตร 50, 100, 200, และ 400 ไมโครลิตร หรือเจลพื้นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำมา spread ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารแข็งชนิด Sabouraud dextrose agar ใน plastic petri dishes (90 mm DIA) โดยใช้ glass spreader จนผิวหน้าของอาหารแข็งแห้ง จากนั้นหยดเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบที่เตรียมจากเชื้อราแต่ละชนิดปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ความหนาแน่นของเชื้อประมาณ $2-10 \times 10^4$ เซลล์) ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ รอจนกระทั่งเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบบนผิวอาหารแข็งแห้ง แล้วนำจานเพาะเชื้อไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน และประเมินผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราในจานเพาะเลี้ยงที่มีเจลพื้น หรือมีเจล

สารสกัดรากทองพันชั่งที่ปริมาตรต่าง ๆ กับจานเพาะเลี้ยงที่ไม่ใส่สารทดสอบ (non-treated)

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในสัตว์ทดลอง

2.6.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อราสำหรับการทดสอบใช้ *M. canis* 13-60-04317 ที่เจือจางเชื้อใน 0.85% sodium chloride เพื่อให้มีความเข้มข้นของเชื้อ 1×10^7 conidia ต่อ มิลลิลิตร

2.6.2 การทดสอบ

การศึกษาประสิทธิภาพของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งต่อการต้านเชื้อราในสัตว์ทดลองใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Ghannoum MA. และคณะ^[20-21] และได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ให้ดำเนินการวิจัยในสัตว์ (หมายเลขควบคุมโครงการ 61-001) เลือกใช้หนูตะเภาสายพันธุ์ Hartley เพศผู้น้ำหนักประมาณ 150-170 กรัม ตรวจประเมินสุขภาพแล้วสุ่มหนูตะเภาใส่ในกรงเลี้ยงขนาดมาตรฐาน และเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 5 วันก่อนการทดสอบ การดูแลสัตว์ทดลองเป็นไปตามมาตรการเลี้ยงสัตว์สากล และให้สัตว์กินอาหารและน้ำอย่างไม่จำกัดปริมาณ การทดสอบแบ่งหนูตะเภาออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1: ไม่ได้รับเชื้อ *M. canis* และไม่ได้รับสารทดสอบ (negative control), กลุ่มที่ 2: ได้รับเชื้อ *M. canis* และได้รับยาต้านเชื้อรา Nizoral® cream (2% ketoconazole), กลุ่มที่ 3: ได้รับเชื้อ *M. canis* และได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% ไรนาแคนทิน ซี), กลุ่มที่ 4: ได้รับเชื้อ *M. canis* และได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.05 % ไรนาแคนทิน ซี) และกลุ่มที่ 5: ได้รับเชื้อ *M. canis* และไม่ได้รับสารทดสอบ (non-treated) หลังจากเลี้ยงปรับ

สภาพดำเนินการโกนขนหนูตะเภาบริเวณด้านหลังแต่ละตัวด้วยเครื่องโกนไฟฟ้า แบ่งผิวหนังที่บริเวณแผ่นหลังของหนูตะเภาแต่ละตัว เป็น 4 ตำแหน่ง โดยแต่ละตำแหน่งจะมีขนาดประมาณ 1.25 เซนติเมตร x 1.25 เซนติเมตร จากนั้นทายาชา lidocaine ในแต่ละตำแหน่งแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที และใช้กระดากทราย เบอร์ 4 ขูดบริเวณทั้ง 4 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 4 ครั้ง แล้วเช็ดทำความสะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์ ทำการหยอดเชื้อรา *M. canis* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทั้ง 4 ตำแหน่ง ของหนูตะเภาแต่ละตัว ตามการแบ่งกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) และทำการเหนียวนาการติดเชื้อของสัตว์ทดลองซ้ำตามขั้นตอนข้างต้น 5 วัน แล้วจึงพักหนูตะเภา 6 วัน หลังจากครบกำหนด นำหนูตะเภาทุกตัวมาทำการเก็บเส้นขนทั้ง 4 ตำแหน่ง โดยในแต่ละตำแหน่งจะเก็บเส้นขนจำนวน 10 เส้น นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อดูการเจริญของเชื้อราบน potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลาอย่างน้อย 7-14 วัน เพื่อเก็บข้อมูลการติดเชื้อเริ่มต้นก่อนได้รับสารทดสอบ จากนั้นหาสารทดสอบตามการแบ่งกลุ่ม โดยในหนูตะเภาแต่ละตัวจะหาสารทดสอบตำแหน่งละ 0.1 มิลลิตร ทั้ง 4 ตำแหน่ง วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน หลังครบกำหนด นำหนูตะเภาทุกตัวมาทำการเก็บเส้นขนทั้ง 4 ตำแหน่ง โดยในแต่ละตำแหน่งจะเก็บเส้นขนจำนวน 10 เส้น นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อดูการเจริญของเชื้อราบน PDA เป็นเวลาอย่างน้อย 7-14 วัน เพื่อเก็บข้อมูลการติดเชื้อหลังได้รับสารทดสอบ และการุณยฆาตหนูตะเภาด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ระหว่างการทดสอบบันทึกข้อมูลของสัตว์ทดลอง ได้แก่ น้ำหนัก อัตราการกินน้ำและอาหาร สุขภาพของสัตว์ทดลอง อาการป่วยและตายในระหว่างวัน อย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง สังเกตรอยโรคที่ผิวหนัง (skin lesion) ทั้ง 4 ตำแหน่งในแต่ละตัว โดย

ให้คะแนนอย่างน้อย 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ตามเกณฑ์ที่กำหนด คือ 0 (ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่ผิวหนัง), 1 (ผิวหนังแดงเล็กน้อย), 2 (ผิวหนังแดงชัดเจน มีการตั้งชันของขนบริเวณที่มีการบวม มีขนร่วง), 3 (ผิวหนังแดงเป็นบริเวณกว้าง มีสะเก็ด มีขนร่วง และมีแผลที่ผิวหนัง), 4 (ผิวหนังบางส่วนถูกทำลาย มีขนร่วง), และ 5 (ผิวหนังถูกทำลายทั้งหมด และขนร่วงทั้งบริเวณนั้น)

2.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลน้ำหนักตัว การกินน้ำ และการกินอาหาร นำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการทดสอบสมมติฐานข้อมูลของค่าเฉลี่ยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (One-way ANOVA ที่ $p < 0.05$) โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 23 กำหนดระดับค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ถ้าผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะทดสอบความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างกับกลุ่มควบคุมด้วย Bonferroni post-hoc test โดยกำหนดระดับค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

2.7 การทดสอบความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

1) การทดสอบการระคายเคืองในสัตว์ทดลอง (animal irritation test)

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนังของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งดำเนินการตามข้อกำหนด ISO 10993-10: 2010^[22] ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [หมายเลขควบคุมโครงการ 62-015 (61-007)] โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ albino จำนวน 3 ตัว แยกเลี้ยงแต่ละตัวในกรงขนาดมาตรฐานเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดสอบ การดูแลสัตว์ทดลอง

เป็นไปตามมาตรการเลี้ยงสัตว์สากล และให้สัตว์กินอาหารและน้ำอย่างไม่จำกัดปริมาณ ก่อนเริ่มทดสอบ 24 ชั่วโมง โกงชนกระต่ายบริเวณหลังด้วยเครื่องโกนไฟฟ้า ใช้ตัวอย่างทดสอบเจลาซารสักรากทองพันชั่ง 0.5 กรัม แปะลงบนตำแหน่งที่ทดสอบด้วยผ้าก๊อชขนาด 2.5 เซนติเมตร x 2.5 เซนติเมตร ตัวละ 2 ตำแหน่ง และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นตัวอย่างควบคุม จากนั้นปิดทับด้วยเทปพันแผล เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงเอาแผ่นทดสอบออก ทำความสะอาดบริเวณทดสอบด้วยน้ำอุ่น และอ่านผลทดสอบชั่วโมงที่ 1, 24, 48 และ 72 หลังเอาแผ่นทดสอบออก โดยให้คะแนนระดับความแดง (erythema) และบวม (oedema) ระหว่าง 0 ถึง 4 คำนวณคะแนนการระคายเคืองเบื้องต้น (Primary Irritation Score, PIS) จากคะแนนเฉพาะที่เวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง แล้วนำ PIS มาคำนวณดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น (Primary Irritation Index, PII) เพื่อให้แปลผลการทดสอบการระคายเคือง

2) การทดสอบการแพ้ทางผิวหนังวิธี closed patch test (Buehler test)

การทดสอบการแพ้ทางผิวหนัง (delayed-type hypersensitivity) ของเจลาซารสักรากทองพันชั่งดำเนินการตามข้อกำหนด ISO 10993-10: 2010^[22] ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [หมายเลขควบคุมโครงการ 63-029 (62-013)] โดยใช้หนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley จำนวน 17 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มทดสอบ 12 ตัว และกลุ่มควบคุม 5 ตัว เลี้ยงแยกเพศกรงละไม่เกิน 5 ตัว ในกรงขนาดมาตรฐานเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 5 วันก่อนการทดสอบ การดูแลสัตว์ทดลองเป็น

ไปตามมาตรการเลี้ยงสัตว์สากล และให้สัตว์กินอาหารและน้ำอย่างไม่จำกัดปริมาณ ก่อนเริ่มทดสอบ 24 ชั่วโมง โกงชนหนูตะเภาบริเวณข้างลำตัวด้านซ้ายขนาด 4 เซนติเมตร x 4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องโกนไฟฟ้า ทดสอบในขั้นตอนการเหนี่ยวนำ (induction phase) ใช้ผ้าก๊อชขนาด 2.5 เซนติเมตร x 2.5 เซนติเมตรซับตัวอย่างทดสอบเจลาซารสักรากทองพันชั่งให้ชุ่ม แล้วแปะลงบนตำแหน่งที่ทดสอบ สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวอย่างทดสอบ จากนั้นปิดทับด้วยเทปพันแผล เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงเอาแผ่นทดสอบออกและทำความสะอาดบริเวณทดสอบด้วยน้ำอุ่น ทำการทดสอบตามวิธีการข้างต้นสัปดาห์ละ 3 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ หลังวันสุดท้ายของการเอาแผ่นทดสอบออก พักสัตว์ทดลอง 14 วัน จากนั้นทดสอบในขั้นตอนการกระตุ้น (challenge phase) โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับขั้นตอนการเหนี่ยวนำ 1 ครั้ง บริเวณด้านข้างลำตัวด้านขวา และอ่านผลทดสอบชั่วโมงที่ 24 และ 48 หลังเอาแผ่นทดสอบออก โดยให้คะแนนตาม Magnusson and Kligman scale^[23]

ผลการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่ง

สารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมตามวิธีการข้างต้นจำนวน 2 ครั้งจากผงแห้งของรากทองพันชั่งน้ำหนัก 240 กรัมและ 390 กรัม พบว่าได้สารสกัดรากทองพันชั่งเมื่อคำนวณเทียบกับน้ำหนักแห้งของรากทองพันชั่ง (% yields, w/w) คิดเป็น 3.08 และ 3.04% ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดรากทองพันชั่งจากแต่ละครั้งของการสกัด มาวิเคราะห์ปริมาณโรนาแคนทิน ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่งพบว่า มีสารโรนาแคนทิน ซี

ตารางที่ 2 น้ำหนักและปริมาณสารโรนาแคนทิน ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่ง

สกัดครั้งที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดรากทองพันชั่ง (กรัม)	% yields(w/w)	ปริมาณสารโรนาแคนทิน ซี (% w/w)	ค่าเฉลี่ย (% w/w)
1	240	7.384	3.08	57.01 56.11 53.01	55.37 ± 2.10
2	390	11.843	3.04	54.09 56.80 55.49	55.46 ± 1.36

คิดเป็นร้อยละ 55.37 ± 2.10 และ 55.46 ± 1.36 โดยน้ำหนัก (w/w) ของสารสกัดรากทองพันชั่ง (ตารางที่ 2) การตรวจวิเคราะห์โลหะหนักในสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยวิธี ICP-MS พบว่าสารสกัดรากทองพันชั่งจากทั้งสองครั้งของการสกัดมีการปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น สารหนู (arsenic) แคดเมียม (cadmium)ปรอท (mercury) และ ตะกั่ว (lead) อยู่ในปริมาณที่กำหนดตามเกณฑ์การยอมรับของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2019^[24] สารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมได้นี้จะนำไปใช้สำหรับพัฒนาตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

2. การพัฒนาตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

การพัฒนาสูตรตำรับเจลพื้นและประเมินคุณลักษณะของตำรับที่เตรียมได้ เพื่อคัดเลือกชนิดของสารก่อเจลที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้พัฒนาตำรับเจลให้มีลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติที่ดี คือ เจลเป็นเนื้อเดียวกัน แพร่กระจายบนผิวได้ดี และมีค่า pH ตรงตามต้องการ โดยอยู่ในช่วง pH ของผิวหนังคนปกติ คือ 5.4-5.9^[25] พบว่าตำรับที่เตรียมจากสารก่อเจล Carbopol 940, Na CMC และ Poloxamer188 ได้เนื้อเจลลักษณะใส เป็นเนื้อเดียวกัน

สามารถกระจายบนผิวได้ดี และเมื่อพิจารณา pH ของตำรับพบว่าเฉพาะตำรับที่ 1 และ 2 ซึ่งมีสารก่อเจลเป็น Carbopol 940 และ Na CMC ตามลำดับ เท่านั้นที่มีค่า pH อยู่ในช่วงที่ต้องการ (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตาม ความหนืดของทั้งสองตำรับยังไม่ตรงตามต้องการ จึงทดลองปรับปริมาณสารก่อเจลในตำรับ โดยใช้สารก่อเจล Carbopol 940 และ Na CMC ในปริมาณต่าง ๆ เพื่อให้ได้ตำรับที่มีความหนืดลดลง พบว่าตำรับที่ใช้สารก่อเจลเป็น 0.3% Carbopol 940 และ 3.25% Na CMC ให้เจลพื้นที่มีลักษณะทางกายภาพและความหนืดตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม ค่า pH ของตำรับที่เตรียมได้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 6-7

เมื่อเติมสารสกัดรากทองพันชั่งปริมาณ 2% w/w ลงในตำรับ บรรจุตำรับลงในภาชนะขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดมิดชิด และนำไปศึกษาความคงตัวของตำรับที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ใช้สารก่อเจลเป็น Carbopol 940 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีลักษณะทางกายภาพของตำรับเปลี่ยนแปลงไป คือ สีของตำรับเปลี่ยนจากส้มเป็นเหลือง มีความหนืด และค่า pH ลดลง นอกจากนี้พบว่าลักษณะเนื้อเจลมีความชุ่มชื้นเพิ่มขึ้น ในขณะที่

ตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ใช้สารก่อเจลเป็น Na CMC มีลักษณะทางกายภาพ ความหนืด และค่า pH ของตำรับไม่เปลี่ยนแปลง จากผลการศึกษาความคงตัวเบื้องต้นของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งดังกล่าว เลือกใช้สารก่อเจลเป็น Na CMC เพื่อให้ตำรับมีความคงตัวทางกายภาพ และเพิ่มสารปรับความเป็นกรด-ด่าง คือ citrate buffer โดยใช้ citric acid monohydrate 0.28% w/w และ tri-sodium citrate dehydrate 1% w/w เพื่อช่วยควบคุมค่า pH ของตำรับให้อยู่ในช่วงที่ต้องการ

การทดสอบการระคายเคืองของตำรับเจลที่มีสารสกัดรากทองพันชั่งปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก (w/w) ในสัตว์ทดลอง พบว่าตำรับดังกล่าวทำให้เกิดความระคายเคืองปานกลางต่อผิวหนังกระต่าย โดยมีค่าดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น (PII) คิดเป็น 2.3 เมื่อทดลองปรับลดปริมาณสารสกัดรากทองพันชั่งลงเป็นร้อยละ 1, 0.5, 0.3, และ 0.15 โดยน้ำหนัก เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดรากทองพันชั่งที่ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายพบว่า ปริมาณสารสกัดรากทองพันชั่งร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก ทำให้เกิดการระคายเคืองเล็กน้อยต่อผิวหนังกระต่าย ในขณะที่

ปริมาณสารสกัดรากทองพันชั่งร้อยละ 0.15 โดยน้ำหนัก ไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย ซึ่งเมื่อคำนวณปริมาณของสารไธนาแคนทิน ซึ่ในตำรับจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ปริมาณสารไธนาแคนทิน ซึ่ในสารสกัดรากทองพันชั่งของการสกัดครั้งที่ 1 (ตารางที่ 2) พบว่าตำรับดังกล่าวจะมีปริมาณสารไธนาแคนทิน ซึ่ คิดเป็น 0.083% w/w

จากข้อมูลผลการทดลองข้างต้น เตรียมตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณไธนาแคนทิน ซึ่ในตำรับคิดเป็น 0.1% w/w และ 0.05% w/w เพื่อใช้สำหรับการศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในระดับหลอดทดลอง และสัตว์ทดลอง โดยตำรับยาเตรียมดังกล่าวมีผลการวิเคราะห์คุณภาพ (ตารางที่ 4)

3. การทดสอบประสิทธิผลของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในหลอดทดลอง

เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของไธนาแคนทิน ซึ่ 0.1% ถูกนำมาทดสอบประสิทธิผลของตำรับในระดับ *in vitro* ด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (agar well diffusion) โดยใช้เจลสารสกัดราก

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติ และ pH ของตำรับเจลพื้น

ลักษณะทางกายภาพ	สัดส่วนสารเคมีในตำรับ (%w/w)				
	ตำรับที่ 1 (Carbopol 940)	ตำรับที่ 2 (Na CMC)	ตำรับที่ 3 (MC)	ตำรับที่ 4 (HEC)	ตำรับที่ 5 (Poloxamer 188)
ลักษณะเนื้อเจล	ใส เป็นเนื้อเดียวกัน	ใส เป็นเนื้อเดียวกัน	ขาวขุ่น ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	ใส ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	ใส เป็นเนื้อเดียวกัน
ความหนืด	มาก	ปานกลาง	ปานกลาง	ปานกลาง	น้อย
การแพร่กระจายบนผิว	ดี	ดี	ดี	ดี	ดี
ให้ความชุ่มชื้นผิว	ดี	ดี	ดี	ดี	ดี
pH	5.5	5.5	4.5	5.0	4.5

ตารางที่ 4 ข้อมูลผลการวิเคราะห์คุณภาพและลักษณะทางกายภาพของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

รายการ	เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง	
ปริมาณสารสำคัญที่กำหนด	0.1% rhinacanthin C	0.05% rhinacanthin C
ลักษณะทางกายภาพ	เจลใสสีน้ำผึ้ง	เจลใสสีน้ำผึ้ง
ปริมาณสารสำคัญจากการวิเคราะห์ (90.0-110.0% ของปริมาณที่ระบุในฉลาก)	99.26%	93.48%
การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์*		
- total aerobic microbial count $\leq 2 \times 10^4$ CFU/g		
- total combined yeast and moulds count $\leq 2 \times 10^1$ CFU/g		
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , absence/g		
- <i>Staphylococcus aureus</i> , absence/g		
- <i>Clostridium</i> spp., absence/g	เข้ามาตรฐาน	เข้ามาตรฐาน
การปนเปื้อนจากโลหะหนัก**		
- Arsenic ≤ 4 ppm		
- Cadmium ≤ 0.3 ppm		
- Lead ≤ 10 ppm		
- Mercury ≤ 0.5 ppm	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
ค่า pH (5.4-5.9)	5.5	5.5
ความหนืด (mPa)	520	510

*BP2018

**Thai Herbal Pharmacopoeia 2019

ทองพันชั่งปริมาณ 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งต่อเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ โดยวัด clear zone ที่เกิดขึ้น แสดงถึงบริเวณที่เชื้อราถูกยับยั้งการเจริญ ผลการทดสอบพบว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้ โดยให้ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใส (zone diameter) ต่อเชื้อ *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* และ *M. canis* (ตารางที่ 5)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของไธนาเคนทิน ซี 0.1% โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากเทคนิค soft-agar overlay แล้วนำ

เจลสารสกัดรากทองพันชั่งหรือเจลพื้นปริมาณ 200 ไมโครลิตรมา spread ลงบนอาหารชนิดแข็งที่มีเชื้ออยู่ และเพาะเลี้ยงเพื่อสังเกตการเจริญของเชื้อรา ผลการทดสอบพบว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำการทดสอบได้ โดยไม่พบการเจริญของเชื้อราเลยเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน ในขณะที่เจลพื้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แต่มีผลทำให้เชื้อเจริญเติบโตลดลงเมื่อเทียบกับ non-treated (ภาพที่ 2)

การทดสอบผลของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ปริมาณต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากการใช้เทคนิค over-agar antibiotic plating พบว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ด้วยวิธี agar well diffusion

สารทดสอบ (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใส (zone diameter, mm)*			
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>
เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C)	34.0 ± 1.0	19.0 ± 1.0	13.5 ± 1.5	19.5 ± 1.5

* รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลุม (well) 8 มิลลิเมตร

ที่ปริมาตรไม่น้อยกว่า 50 ไมโครลิตร เมื่อ spread ลงบนอาหารชนิดแข็งพื้นที่ประมาณ 57 ตารางเซนติเมตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 3 วัน (ภาพที่ 3)

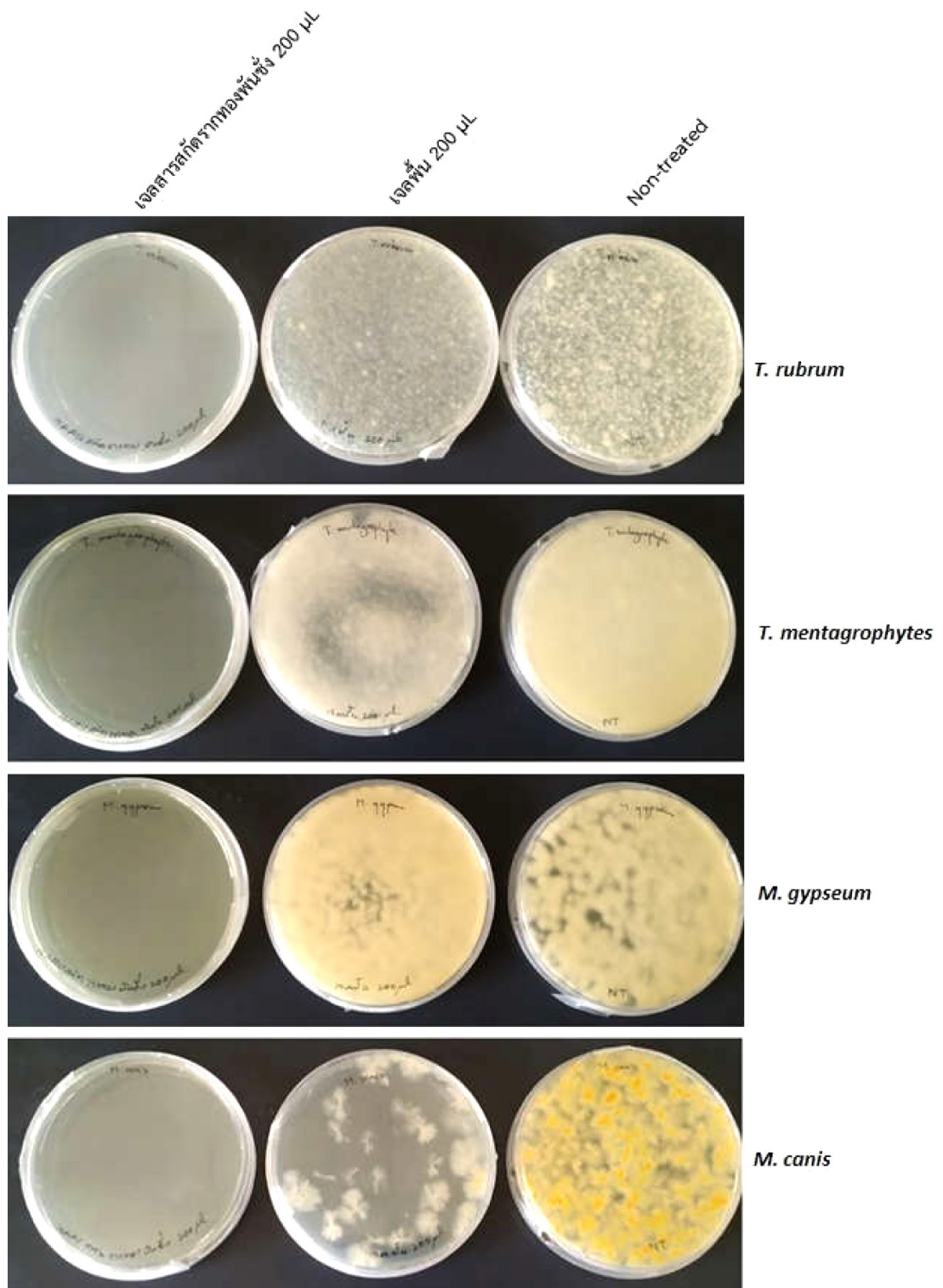
4. การทดสอบประสิทธิภาพของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในระดับสัตว์ทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในระดับ *in vivo* โดยใช้หนูตะเภานำมาเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ และทดสอบผลของตำรับต่อสัตว์ทดลอง และความสามารถในการลดการติดเชื้อของตำรับ โดยเก็บข้อมูลน้ำหนักของสัตว์ทดลองตลอดการศึกษา ซึ่งหนูตะเภามีน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 150-170 กรัม พบว่าน้ำหนักสัตว์เฉลี่ยในแต่ละกลุ่มตลอดการทดสอบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสัตว์ตั้งแต่วันที่เริ่มจนจบการทดสอบ โดยมีน้ำหนักในวันสิ้นสุดการทดสอบประมาณ 340-540 กรัม สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มมีอัตราการกินอาหารเฉลี่ยต่อสัปดาห์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ถึง 4 ของการทดสอบ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนอัตราการกินน้ำเฉลี่ยต่อสัปดาห์ของหนูตะเภา พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ของสัตว์กลุ่มที่ได้รับยาต้านเชื้อรา ketoconazole cream มีอัตราการกินน้ำลดลงอย่างมีนัยสำคัญทาง

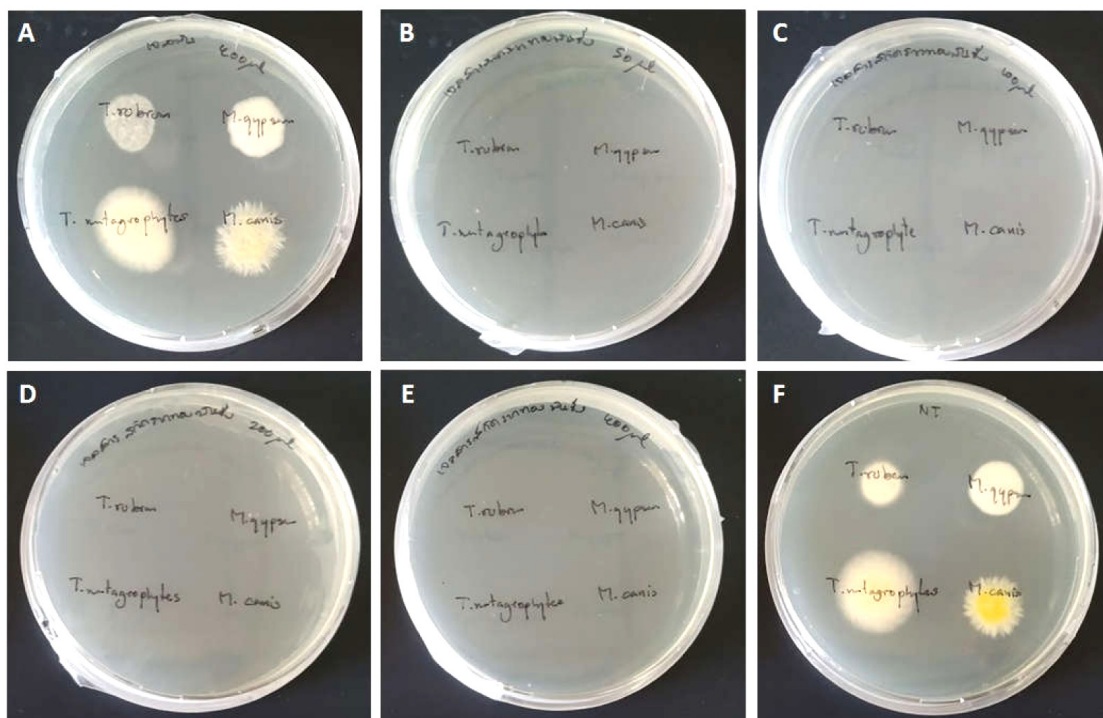
สถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเจลสารสกัดทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% ($p = 0.030$)

การตรวจสอบสุขภาพและพฤติกรรมทั่วไปของสัตว์ทดลอง แบ่งเป็น ระบบหายใจ ลักษณะการเคลื่อนไหว การตอบสนองของระบบประสาทส่วนกลาง การตอบสนองต่อสิ่งเร้า ระบบหมุนเวียนโลหิต และลักษณะดวงตา พบว่าไม่มีสัตว์ที่มีอาการหรือพฤติกรรมที่ผิดปกติตลอดการทดสอบ นอกจากนี้ ผลการเพาะเชื้อจากการเก็บเส้นขนบริเวณทดสอบในหนูตะเภาแต่ละตัว ทั้ง 4 ตำแหน่ง กลุ่มละ 6 ตัว ก่อนและหลังการให้สารทดสอบ พบว่าจำนวนเส้นขนที่พบเชื้อราหลังจากได้รับสารทดสอบ 14 วัน มีจำนวนลดลงในทุกกลุ่ม

การประเมินอัตราการติดเชื้อหลังหนูตะเภาได้รับสารทดสอบครบกำหนด โดยเทียบเป็นสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ต่อจำนวนเชื้อราก่อนการทดสอบในแต่ละกลุ่ม พบว่าหลังการทดสอบหนูตะเภากลุ่มที่ได้รับยาต้านเชื้อรา ketoconazole cream มีอัตราการติดเชื้อเหลืออยู่ 4.26% กลุ่มที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% มีอัตราการติดเชื้อ 11.46% กลุ่มที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.05% มีอัตราการติดเชื้อ 28.05% และหนูตะเภากลุ่มที่ได้รับเชื้อราแต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (non-treated)



ภาพที่ 2 ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร



ภาพที่ 3 ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์บนอาหารแข็งที่มีเจลพื้นปริมาตร 400 ไมโครลิตร (A), เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ปริมาตร ดังนี้ 50 ไมโครลิตร (B), 100 ไมโครลิตร (C), 200 ไมโครลิตร (D), 400 ไมโครลิตร (E) และ ไม่มีสารทดสอบ (non-treated) (F)

มีอัตราการติดเชื้อ 28.33% (ตารางที่ 6)

การประเมินประสิทธิผลของการลดการติดเชื้อราเมื่อใช้สารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (non-treated) โดยใช้สูตร $100 - (T \times (100/N))$ เมื่อ T คือ อัตราการติดเชื้อราของกลุ่มทดสอบ และ N คือ อัตราการติดเชื้อราของกลุ่มที่ได้รับเชื้อราแต่ไม่ได้รับสารทดสอบ พบว่ายาต้านเชื้อรา ketoconazole cream มีประสิทธิผลลดจำนวนเชื้อราได้ 84.96% และเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% มีประสิทธิผลลดจำนวนเชื้อราได้ 59.55% เมื่อคิดเทียบจากเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (non-treated) ส่วนเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.05% พบว่าไม่มี

ประสิทธิผลในการลดจำนวนเชื้อราได้ (ลดจำนวนเชื้อราได้ 0.99%) (ตารางที่ 6)

การประเมินผลรอยโรคที่ผิวหนังโดยการให้คะแนนวิธีการของผิวหนังตามเกณฑ์ที่กำหนด ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มต้นเหนี่ยวนำการติดเชื้อราจนกระทั่งได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนนเฉลี่ยของรอยโรคที่เกิดขึ้นจากการทดสอบ โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของรอยโรคของผิวหนังในกลุ่มของหนูตะเภาที่ได้รับยาต้านเชื้อรา ketoconazole cream กลุ่มที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% กลุ่มที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.05% และกลุ่มที่ได้รับเชื้อราแต่ไม่ได้รับยาต้าน

ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อราที่พบจากเส้นขนบริเวณทดสอบในหนูตะเภา อัตราการติดเชื้อหลังสิ้นสุดการทดสอบ และ ประสิทธิภาพในการลดการติดเชื้อรา

กลุ่ม	จำนวนเส้นขนที่พบเชื้อรา (จำนวน ขนที่พบเชื้อรา/จำนวนขนทั้งหมด)		อัตราการติดเชื้อ (%)	ประสิทธิภาพ ในการลด การติดเชื้อรา
	ก่อนรับสาร	หลังรับสาร	หลังครบกำหนด	การติดเชื้อรา (%)
	ทดสอบ	ทดสอบ	การทดสอบ 14 วัน	
negative control	0/240	0/240	0	0
2% ketoconazole cream	94/240	4/240	4.26	84.96
0.1% rhinacanthin C gel	96/240	11/240	11.46	59.55
0.05% rhinacanthin C gel	82/240	23/240	28.05	0.99
non-treated	60/240	17/240	28.33	-

เชื้อรา (positive control) มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อราและไม่ได้รับยาต้านเชื้อรา (negative control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) นอกจากนี้ พบว่าค่าเฉลี่ยของรอยโรคของผิวหนังในหนูกลุ่มที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% มากกว่ากลุ่มหนูตะเภาที่ได้รับยาต้านเชื้อรา ketoconazole cream อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.023$)

5. การทดสอบความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในสัตว์ทดลอง

การทดสอบความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% ในสัตว์ทดลอง โดยทำการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนังพบว่าตำรับดังกล่าวไม่ทำให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย โดยมีค่าดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น (PII) คิดเป็น 0.3 และเมื่อนำเจลสารสกัดรากทองพันชั่งไปทดสอบการแพ้ทางผิวหนังวิธี closed patch test (Buehler test) โดยใช้หนูตะเภา และอ่านผลเปรียบเทียบกับ Magnusson

และ Kligman scale^[23] พบว่าตำรับดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดการแพ้ในสัตว์ทดลองทุกตัวที่ทำการศึกษา โดยมี sensitization rate คิดเป็นร้อยละ 0

อภิปรายผล

การนำสมุนไพรมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีคุณภาพ ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพการรักษาตรงตามที่ระบุ จำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการผลิตสารสกัด จนกระทั่งได้เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพื่อให้มั่นใจว่าทุกขั้นตอนการผลิตถูกต้อง มีความสม่ำเสมอของตัวยาสำคัญ และไม่มีสารอันตรายตกค้าง ซึ่งการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นตัวยาคำคัญ ถ้าเป็นสมุนไพรตามข้อกำหนดของตำรายาที่รัฐมนตรีประกาศให้อ้างอิงข้อกำหนดนั้น ๆ แต่ในกรณีเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดของตำรายาให้ใช้ข้อกำหนดมาตรฐานที่จัดทำขึ้นโดยผู้ผลิตได้^[26] ซึ่งทองพันชั่งเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่ยังไม่มีข้อกำหนดของตำรายา ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบจึงเลือกควบคุมปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ซึ่งเป็นสารสำคัญ

ที่เป็นสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยวิธี HPLC และตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักในสารสกัดด้วยวิธี ICP-MS ผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดรากทองพันชั่งจากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง มีปริมาณสารสำคัญตามที่ต้องการ และไม่พบโลหะหนักที่มีพิษปนเปื้อนเกินเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด

ปัจจุบันยาต้านเชื้อราสำหรับใช้ภายนอกมีอยู่หลายรูปแบบ ได้แก่ ครีม เจล ยาน้ำ ขี้ผึ้ง และแชมพู โดยการพัฒนารูปแบบตำรับจะสัมพันธ์กับคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวยาสำคัญ^[27] สารสกัดรากทองพันชั่งสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ และละลายได้น้อยในน้ำ การศึกษาจึงเลือกพัฒนาตำรับในรูปแบบเจลที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ เริ่มต้นจากการพัฒนาสูตรตำรับเจลพื้นสำหรับใช้เตรียมเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง เลือกใช้สารก่อเจลเป็น Na CMC และเพิ่ม citrate buffer สำหรับควบคุม pH ของตำรับ โดยใช้ 0.28% citric acid และ 1% sodium citrate ควบคุมค่า pH ของเจลให้เป็นกรด (pH 5.5) เพื่อให้เหมาะสมกับสภาพผิวหนังปกติ ลดความเสี่ยงในการเกิดการระคายเคือง และลดการติดเชื้อที่ผิวหนัง^[28] ซึ่งปริมาณสารปรับความเป็นกรด-ด่างทั้งสองชนิดที่เลือกใช้อยู่ในช่วงที่มีการใช้กันโดยทั่วไปสำหรับผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ภายนอกชนิดไม่ต้องล้างออก (0.0000005 - 4% citric acid และ 0.000005 - 10% sodium citrate)^[29] ในเบื้องต้นกำหนดปริมาณสารสำคัญไทรเนแคนทิน ซี ในตำรับเป็น 0.1% w/w โดยเลือกจากข้อมูลผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัด และใช้แอลกอฮอล์ละลายสารสกัดรากทองพันชั่งเพื่อผสมในตำรับ โดยใช้เอทานอล 10% โดยน้ำหนัก ซึ่งเอทานอลในปริมาณดังกล่าวนี้มีผลเชิงบวกสำหรับการกระตุ้นรักษาแผล (wound healing)^[30]

นอกจากนี้จากผลการศึกษาความคงตัวของตำรับเบื้องต้นจึงเลือกใช้บรรจุภัณฑ์เป็นขวดทึบแสงที่ปิดสนิท เพื่อลดโอกาสการระเหยของแอลกอฮอล์ในตำรับที่จะทำให้ตัวยาสสำคัญละลายในตำรับได้ลดลง และทำให้ตำรับข้น รวมถึงหลีกเลี่ยงการเก็บรักษาตำรับในที่ที่มีอากาศร้อน ซึ่งสภาวะการเก็บรักษาดังกล่าวจะทำให้ตำรับมีความคงตัวดีขึ้น สภาวะการเก็บรักษาที่กำหนดขึ้นนี้สอดคล้องกับการศึกษาความคงตัวของสารสกัดรากทองพันชั่งที่เคยมีรายงานมาก่อน^[3]

จากสูตรตำรับดังกล่าวเตรียมเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไทรเนแคนทิน ซี 0.1% และ 0.05% w/w แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพ โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธี HPLC พบว่าตำรับที่เตรียมได้ทั้งหมดมีปริมาณสารไทรเนแคนทิน ซี อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ร้อยละ 90.0-110.0 ของปริมาณที่ระบุในฉลาก) การวิเคราะห์การปนเปื้อนจุลชีพ (microbial limit test) และการปนเปื้อนโลหะหนัก (heavy metal test) พบว่าตำรับที่เตรียมได้ทั้ง 2 ตำรับ ไม่มีการปนเปื้อนจุลชีพ และไม่พบโลหะหนักที่เป็นพิษต่อร่างกาย ดังนั้นเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมได้นี้จึงมีคุณภาพตรงตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

การทดสอบผลของตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ชนิดต่าง ๆ ระดับ *in vitro* ด้วยวิธี agar well diffusion แสดงให้เห็นว่า เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไทรเนแคนทิน ซี 0.1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราออกโรคทั้ง 4 ชนิดที่ทำการทดสอบได้ ในขณะที่เจลพื้นไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา และเมื่อเปรียบเทียบผลของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำการทดสอบแต่ละชนิด พบว่า เจลสารสกัดรากทองพันชั่งสามารถยับยั้งการเจริญ

ของเชื้อ *T. rubrum* ได้ดีกว่าเชื้อราชนิดอื่นที่ทำการทดสอบ โดยทำให้เกิด clear zone ขนาดใหญ่กว่าเชื้อราชนิดอื่นอย่างชัดเจนเมื่อเพาะเลี้ยงในระยะเวลาที่เท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการที่ *T. rubrum* เป็นเชื้อที่มีอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) ช้าที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ชนิดอื่นที่ทำการทดสอบ^[31-32] โดย *T. rubrum* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในโรคกลากที่บริเวณมือ (Tinea manuum) เท้า (Tinea pedis) ขาหนีบ (Tinea cruris) และลำตัว (Tinea corporis)^[33-35] ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่พัฒนาขึ้นสามารถต้านเชื้อราก่อโรคกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ได้จริงในระดับหลอดทดลอง

การทดสอบเพื่อประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของเจลสารสกัดทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากเทคนิค soft-agar overlay เพื่อศึกษาผลของตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่กระจายตัวครอบคลุมพื้นที่ผิวอาหารแข็งประมาณ 57 ตารางเซนติเมตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดต่าง ๆ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งตามปริมาณดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำการทดสอบได้เป็นระยะเวลามากกว่า 5 วัน ในขณะที่เจลพื้นไม่สามรถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ แต่มีผลทำให้เชื้อเจริญเติบโตลดลงเมื่อเทียบกับ Non-treated โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *M. canis* พบว่ามีการเจริญของเชื้อลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 2) ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากสารถนอมที่ใช้ในตำรับ ซึ่งประกอบด้วย 0.1% เมทิลพาราเบน และ 0.02% โพรพิลพาราเบน โดยพาราเบนนั้นเป็นสารในกลุ่มฟีนอลที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต่อทั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา มีกลไกการออกฤทธิ์เป็นสาร

ถนอมที่หลากหลาย เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน DNA และ RNA รบกวนการขนส่งสารอาหารผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วของไซโตพลาสซึม และยับยั้งการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในเชื้อรา^[36]

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% ปริมาตรต่าง ๆ ที่กระจายตัวครอบคลุมพื้นที่ผิวประมาณ 57 ตารางเซนติเมตร โดยประเมินผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลังเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน (ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากการใช้เทคนิค over-agar antibiotic plating) พบว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งทุกปริมาตรที่ทำการทดสอบ (50, 100, 200 และ 400 ไมโครลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 4 ชนิดที่ทำการศึกษได้ในขณะที่เจลพื้นไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ปริมาตรประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อพื้นที่ผิว 1 ตารางเซนติเมตร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

การทดสอบประสิทธิภาพของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในสัตว์ทดลอง ได้ทำการทดสอบในหนูตะเภาที่เหนียวทำให้เกิดการติดเชื้อรา *M. canis* ที่ผิวหนัง โดยผลการศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาโมเดลการทดสอบ พบว่าการเหนียวทำให้เกิดเชื้อราด้วยเชื้อชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อราที่ผิวหนังในหนูตะเภาได้ดีในสภาวะที่ทำการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *T. mentagrophytes* (ไม่ได้แสดงผลการศึกษา) ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Saunte และคณะ ที่พบว่าเชื้อรา *M. canis* สายพันธุ์ที่ทำการศึกษทั้ง laboratory reference strain และ clinical isolate รวม 3 ชนิด สามารถทำให้สัตว์ทดลองติดเชื้อได้ 100 % ในขณะที่เชื้อรา *T. menta-*

grophytes มีเพียง laboratory reference strain ที่สามารถทำให้สัตว์ทดลองติดเชื้อ 100% แต่เชื่อว่าเป็น clinical isolate สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในสัตว์ทดลองได้บางตัวเท่านั้น^[37]

การเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ *M. canis* ในสัตว์ทดลอง พบว่าการติดเชื้อเริ่มต้นมีสัดส่วนต่างกันในแต่ละกลุ่ม โดยกลุ่มทดสอบที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% มีการติดเชื้อเริ่มต้นสูงสุด ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับเชื้อราแต่ไม่ได้รับสารทดสอบมีการติดเชื้อเริ่มต้นต่ำสุด หลังจากทำการทาสารทดสอบต่อเนื่องวันละครั้งเป็นระยะเวลา 14 วัน และตรวจสอบการติดเชื้อ พบว่าสัตว์ทดลองทุกกลุ่มมีการติดเชื้อลดลง รวมถึงกลุ่มทดสอบที่ได้รับเชื้อราแต่ไม่ได้รับสารทดสอบด้วย (ตารางที่ 6) การติดเชื้อที่ลดลงโดยไม่ได้รับสารต้านเชื้อรานี้เกิดจากกลไกในการรักษาตนเอง (spontaneous healing) ซึ่งเป็นผลของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) ที่เกิดขึ้นในโมเดลสัตว์ทดลองที่เป็นหนูตะเภา และแตกต่างจากโรคกลากในคนซึ่งไม่สามารถหายได้เอง แม้จะมีการนำหนูตะเภามาใช้เพื่อศึกษาการติดเชื้อรากกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์และประเมินผลการรักษาอย่างแพร่หลาย แต่ความสามารถในการรักษาตนเองที่เกิดขึ้นนี้นับเป็นข้อจำกัดของโมเดลสัตว์ทดลองดังกล่าว^[38]

การทดสอบประสิทธิผลในการต้านเชื้อราของ ketoconazole cream พบว่าสามารถลดการติดเชื้อราได้ 84.96% ในขณะที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% มีประสิทธิผลในการลดการติดเชื้อราลงได้ 59.55% และเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.05% ไม่มีประสิทธิผลในการลดการติดเชื้อรา นอกจากนี้ ผลการประเมินผลรอยโรคของ

กลุ่มทดสอบที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ได้รับยาต้านเชื้อรา ketoconazole cream พบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มทดสอบที่ได้รับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% มีค่าเฉลี่ยคะแนนรอยโรคบริเวณผิวหนังมากกว่ากลุ่มทดสอบที่ได้รับยาต้านเชื้อรา ketoconazole cream โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการประเมินประสิทธิผลของสารทดสอบที่พบว่ายาต้านเชื้อรา ketoconazole cream สามารถลดการติดเชื้อราได้ดีกว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% จากผลการทดสอบในระดับสัตว์ทดลองนี้จะเห็นได้ว่าตำรับที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% สามารถต้านการติดเชื้อราได้ แต่ยังไม่ดีเท่า ketoconazole cream เมื่อใช้ยาแต่ละชนิดวันละครั้งเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ ketoconazole cream มีวิธีใช้คือทาบริเวณที่มีอาการวันละครั้งเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์^[39] ในขณะที่การใช้สมุนไพรทองพันชั่งสำหรับรักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื่อน จะให้ทาบริเวณที่มีอาการวันละ 2-3 ครั้ง จนกว่าจะหาย^[11-12] หรือยาทิงเจอร์ทองพันชั่งจะให้ใช้ทาบริเวณที่มีอาการ วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ทาจนกว่าจะหาย และใช้ต่อเนื่องอีกอย่างน้อย 2 สัปดาห์^[16] ซึ่งขนาดยาของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ใช้ในการทดสอบในสัตว์ทดลองครั้งนี้อาจมีขนาดไม่เพียงพอส่งผลให้ได้ผลการรักษาต่ำกว่า ketoconazole cream ดังนั้นขนาดและวิธีใช้ที่เหมาะสมสำหรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% จึงควรเป็นทาบริเวณที่มีอาการ วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เช่นเดียวกับขนาดและวิธีใช้ของทิงเจอร์ทองพันชั่ง อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อ

ยืนยันขนาดและวิธีการใช้ที่เหมาะสมสำหรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% นอกจากนี้ จากผลการทดสอบของตำรับเจลที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.05% ไม่มีประสิทธิผลในการลดการติดเชื้อรา เป็นสิ่งที่ยืนยันได้ว่าการผลิตยาจากสมุนไพร ควรมีการกำหนดปริมาณสารสำคัญและการควบคุมคุณภาพเพื่อให้การผลิตยาแต่ละครั้งมีคุณภาพคงที่ และมีประสิทธิผลในการใช้รักษาโรค

การทดสอบความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% ในสัตว์ทดลอง แสดงให้เห็นว่าตำรับดังกล่าวไม่ทำให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ในหนูตะเภาทุกตัวที่ทำการศึกษา ดังนั้นตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีความปลอดภัยสำหรับใช้ทาผิวหนัง

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาสูตรตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารโรนาแคนทิน ซี 0.1% w/w วิเคราะห์คุณภาพ ทดสอบประสิทธิผลของตำรับในการต้านเชื้อรา และศึกษาความปลอดภัยของตำรับโดยทดสอบการระคายเคืองและทดสอบการแพ้ทางผิวหนังตามมาตรฐาน ISO 10933-10 ผลการศึกษาพบว่าตำรับที่เตรียมได้มีคุณภาพตรงตามเกณฑ์ที่กำหนด การทดสอบประสิทธิผลในการต้านเชื้อราของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง พบว่าตำรับมีฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ได้ดีในระดับหลอดทดลอง และผลการทดสอบความปลอดภัยพบว่าตำรับไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายและไม่ก่อให้เกิดการแพ้ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบประสิทธิผลของตำรับในสัตว์ทดลอง พบว่าตำรับลดการติดเชื้อราได้

แต่ยังไม่ดีเท่า ketoconazole cream เมื่อใช้ยาแต่ละชนิดวันละครั้งเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่พัฒนาขึ้นตามวิธีการดังกล่าวอาจยังไม่เหมาะสม จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับขนาดและวิธีใช้ที่เหมาะสมในการรักษา หรืออาจพัฒนาตำรับใหม่ให้อยู่ในรูปการนำส่งแบบนาโน (nanocarriers) เพื่อช่วยเพิ่มผลการรักษาและลดความเป็นพิษ^[40] แล้วจึงนำไปศึกษาในระดับคลินิกเพื่อประเมินผลความปลอดภัยในอาสาสมัครสุขภาพดี และประเมินประสิทธิผลของตำรับในการรักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังจากเชื้อราต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจระบุชื่อชนิดพันธุ์พืชและเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพื่องานวิจัย, ขอขอบคุณสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การอนุเคราะห์ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนจากโลหะหนักที่มีพิษของสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยเทคนิค Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) และขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

References

1. Suman B, Raghu PS, Sailaja G, Thyaga R K. The study on morphological, phytochemical and pharmacological aspects of *Rhinacanthus nasutus*. (L) Kurz (A Review). Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011;1(8):26-32.
2. Siripong P, Wongseri V, Piyaviriyakul S, Yahaufai J, Chanpai R, Kanokmedakul K. Antibacterial potential of *Rhinacanthus nasutus* against clinically isolated bacteria from Thai cancer patients. Mahidol University Journal of

- Pharmaceutical Sciences. 2006;33(1-4):15-22.
3. Puttarak P, Charoonratana T, Panichayupakaranant P. Antimicrobial activity and stability of rhinacanthins-rich *Rhinacanthus nasutus* extract. *Phytomedicine*. 2010;17(5):323-7.
 4. Kodama O, Ichikawa H, Akatsuka T, Santisopasri V, Kato A, Hayashi Y. Isolation and identification of an antifungal naphthopyran derivative from *Rhinacanthus nasutus*. *J Nat Prod*. 1993;56(2):292-4.
 5. Pruksakorn P, Jaima C, Panyajai P, Mekha N, Autthatein-chai R, Dhepakorn P. Antifungal activity of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz extract against dermatophytes. *J Thai Trad Alt Med*. 2018;16(2):205-17. (in Thai)
 6. Sendl A, Chen J L, Jolad S D, Stoddart C, Rozhon E, Kernan M, Nanakorn W, Balick M. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. *J Nat Prod*. 1996;59(8):808-11.
 7. Thongchuai B, Tragoolpua Y, Sangthong P, Trisuwan K. Antiviral carboxylic acids and naphthoquinones from the stems of *Rhinacanthus nasutus*. *Tetrahedron Letters*. 2015;56(37):5161-3.
 8. Bhusal N, Panichayupakaranant P, Reanmongkol W. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of a standardized *Rhinacanthus nasutus* leaf extract in comparison with its major active constituent rhinacanthin-C. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2014;36(3):325-31.
 9. Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Effects of rhinacanthins from *Rhinacanthus nasutus* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor- α releases using RAW264.7 macrophage cells. *Phytomedicine*. 2009;16(6-7):581-5.
 10. Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Anti-allergic principles of *Rhinacanthus nasutus* leaves. *Phytomedicine*. 2009;16(10):929-34.
 11. Petplai D, Tinnakorn Na Ayuthaya P, Bunsit J. List of herbal medicines and indications for primary health care service. Bangkok: Department of Medical Sciences; 1979. (in Thai)
 12. Thailand Association of Traditional Medicine School Wat PhraChetuphon (Wat Pho) Tha Thien Pranakorn. Handbook of Thai pharmacist Drug Act B.E. 2510 and ministerial regulation. 2nd ed. Bangkok: Ampolpittaya; 1869. (in Thai)
 13. Darah I, Jain K. Efficacy of the *Rhinacanthus nasutus* Nees Leaf extract on dermatophytes with special reference to *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* and *Microsporum canis*. *Nat Prod Sci*. 2001;7(4):114-9.
 14. Deepa N, Ravichandran V. Anti-fungal activity of various extracts of *Rhinacanthus nasutus* (L). Kurtz. *Nat Prod Indian J*. 2008;4(2):125-7.
 15. Wisuitiprot W. Antifungal activity of *Rhinacanthus nasutus* extract against *Malassezia* sp. *J Health Sci*. 2012;21(3):521-8. (in Thai)
 16. Bureau of Drug Control, Food and Drug Administration. National list of essential medicines 2013. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand Printing Press, Ltd.; 2013. (in Thai)
 17. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-9.
 18. Kakande T, Batunge Y, Eilu E, Shabohurira A, Abimana J, Akinola SA, Muhwezi R, Adam AS, Onkoba SK, Aliero AA, Atuheire C, Kato CD, Ntulumbe I. Prevalence of dermatophytosis and antifungal activity of ethanolic crude leaf extract of *Tetradenia riparia* against dermatophytes isolated from patients attending Kampala International University Teaching Hospital, Uganda. *Dermatol Res Pract*. 2019;2019:9328621.
 19. Hockett KL, Baltrus DA. Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. *J Vis Exp*. 2017;119:55064.
 20. Ghannoum MA, Hossain MA, Long L, Mohamed S, Reyes G, Mukherjee PK. Evaluation of antifungal efficacy in an optimized animal model of *Trichophyton mentagrophytes* dermatophytosis. *J Chemother*. 2004;16(2):139-44.
 21. Ghannoum MA, Long L, Pfister WR. Determination of the efficacy of terbinafine hydrochloride nail solution in the topical treatment of dermatophytosis in a guinea pig model. *Mycoses*. 2009;52(1):35-43.
 22. Technical Committee ISO/TC 194. ISO10993-10: 2010. Biological evaluation of medical devices-Part 10: Test for irritation and skin sensitization. 2010. 67 p.
 23. Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol*. 1969;52(3):268-76.
 24. Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia 2019 Vol. I and II. Nonthaburi: Bureau of Drug and Narcotics, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.
 25. Braun-Falco O, Korting HC. Normal pH value of human

- skin. Hautarzt. 1986;37(3):126-9. (in German)
26. Payakprom P. Quality control of herbal products. GPO R&D Newsletter. 2015;22(4):2-7. (in Thai)
27. Nakusha D, Prakash K, Vishal P. Emerging trends in topical antifungal therapy: A review. *Inventi Rapid: NDDS*. 2015;2015(2):1-5.
28. Schmid-Wendtner M-H, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(2):296-302.
29. Fiume MM, Heldreth BA, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks Jr JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Safety assessment of citric acid, inorganic citrate salts, and alkyl citrate esters as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2014;33(2 suppl):16s-46s.
30. Lachenmeier DW. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *J Occup Med Toxicol*. 2008;3:26.
31. Aliô AB, Mendoza M, Zambrano EA, Díaz E, Cavallera E. Dermatophytes growth curve and *in vitro* susceptibility test: a broth micro-titration method. *Med Mycol*. 2005;43(4):319-25.
32. Achterman RR, Smith AR, Oliver BG, White TC. Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal Genet Biol*. 2011;48(3):335-41
33. Luplertlop N, Suwanmanee S. Dermatophytosis: from bench to bedside. *J Trop Med Parasitol*. 2013;36:75-87.
34. Hayette MP, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep*. 2015;9:164-79.
35. Ungpakorn R. Mycoses in Thailand: current concerns. *Jpn. J. Med. Mycol*. 2005;46(2):81-6.
36. Halla N, Fernandes IP, Heleno SA, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Rodrigues AE, Ferreira ICFR, Barreiro MF. Cosmetics preservation: a review on present strategies. *Molecules*. 2018;23(7):1571.
37. Saunte DM, Hasselby JP, Brillowska-Dabrowska A, Frimodt-Müller N, Svejgaard EL, Linnemann D, Nielsen SS, Haedersdal M, Arendrup MC. Experimental guinea pig model of dermatophytosis: a simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Med Mycol*. 2008;46(4):303-13.
38. Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal model of dermatophytosis. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:125384.
39. Poojary SA. Topical antifungals: A review and their role in current management of dermatophytoses. *Clin Dermatol Rev*. 2017;1(3):24-9.
40. Garg A, Sharma GS, Goyal AK, Ghosh G, Si SC, Rath G. Recent advances in topical carriers og anti-fungal agents. *Heliyon*. 2020;6(8):e04663.