

การทดสอบการระคายเคืองเฉียบพลันทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในกระต่าย ของเจลสารสกัดทองพันชั่งที่มี rhinacanthin 0.2%

ปฐมพร ปริกษาร^{*†}, วิจารณ์ หมายติดกลาง[†], มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์[†], พรศรี ประเสริฐวารี^{*}

^{*} สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

[†] ศูนย์สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

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

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) เป็นไม้พุ่มในวงศ์ Acanthaceae พบมากในเขตร้อนชื้น เช่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีนตอนใต้ และอินเดีย ในทางการแพทย์แผนไทยส่วนใบและรากของทองพันชั่งถูกนำมาใช้รักษาโรคผิวหนัง ได้แก่ ผื่นคัน กลาก และเกลื้อน โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่มควิโนน (naphthoquinone) เป็นสารออกฤทธิ์หลักในการต้านเชื้อรา การศึกษาที่ผ่านมามีการพัฒนาเจลสารสกัดรากทองพันชั่งเป็นผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรสำหรับใช้ภายนอกเพื่อรักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา โดยตำรับมีปริมาณไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก และมีข้อมูลยืนยันความปลอดภัยทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์ อย่างไรก็ตาม ตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น เช่น มีไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ยังไม่มีข้อมูลด้านความปลอดภัย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ในกระต่าย เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยของตำรับเบื้องต้นก่อนนำไปศึกษา dose response ในผู้ป่วย

วิธีการศึกษา: สกัดรากแห้งของทองพันชั่งและหาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ด้วยวิธี RP-HPLC เตรียมเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก และประเมินคุณภาพของตำรับ ได้แก่ การตรวจลักษณะทางกายภาพ ค่า pH การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตำรับ รวมถึงตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก จากนั้นนำเจลสารสกัดรากทองพันชั่งไปทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนด้วยวิธีทดสอบตาม OECD Guideline No. 404 ในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White โดยเริ่มจากการทดสอบการกัดกร่อนผิวหนัง (skin corrosion test) ในกระต่าย 1 ตัว และติดตามอาการทางผิวหนัง เช่น รอยแดง (erythema) และบวม (oedema) หรือสัญญาณของผิวหนังถูกทำลาย และอาการไม่พึงประสงค์อื่น หากไม่พบการกัดกร่อน จึงดำเนินการทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation test) ในกระต่ายอีก 2 ตัว เพื่อประเมินการก่อให้เกิดการระคายเคือง

ผลการศึกษา: เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง ร้อยละ 0.2 (0.2% rhinacanthin C) ที่เตรียมได้มีลักษณะทางกายภาพเหมาะสม ปริมาณสารสำคัญไรนาแคนทิน-ซี อยู่ในช่วงที่กำหนด 90.0 – 110.0% (90.0 – 110.0% label amount) ไม่

พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ หรือโลหะหนักเกินค่ามาตรฐาน และมีค่า pH 5.5 ซึ่งเหมาะสมต่อการใช้กับผิวหนัง ผลการทดสอบการกักร้อนผิวหนังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสภาพผิวหนัง แสดงว่าตำรับไม่ก่อให้เกิดการกักร้อน การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังพบว่าตำรับมีค่าเฉลี่ยของการแดงในสัตว์แต่ละตัวอยู่ในช่วง 0.67 – 1.00 และมีค่าเฉลี่ยของการบวมอยู่ในช่วง 0 – 0.67 ซึ่งอยู่ในช่วง 0 ถึง <1.5 ตามเกณฑ์การประเมิน แสดงให้เห็นว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อการระคายเคืองทางผิวหนัง

อภิปรายผล: แม้ว่าผลการทดสอบจะไม่พบการระคายเคืองทางผิวหนังหรือกักร้อน แต่ค่าเฉลี่ยของการแดง และการบวมที่พบในสัตว์ทดลองมีค่าสูงกว่าที่เคยรายงานในตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของการแดงอยู่ที่ 0.33 – 0.67 และไม่พบการบวม ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน-ซี อาจมีผลต่อระดับการตอบสนองของผิวหนัง ดังนั้นตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี สูงกว่าร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก อาจมีความเสี่ยงต่อการก่อให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนังเพิ่มขึ้น

ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ: เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อการระคายเคืองทางผิวหนังและไม่ก่อให้เกิดการกักร้อนในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White ในการทดสอบด้วยวิธีตาม OECD Guideline No. 404 การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นว่าตำรับดังกล่าวมีความปลอดภัยเบื้องต้นสำหรับการใช้ทาผิวหนัง และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการศึกษาในระดับคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิผลและความปลอดภัยของตำรับในการรักษาโรคผิวหนังจากเชื้อราในผู้ป่วยได้ต่อไป

คำสำคัญ: เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง ไรนาแคนทิน-ซี ความปลอดภัย การระคายเคือง การกักร้อน

Acute Dermal Irritation/Corrosion Testing in Rabbits of *Rhinacanthus nasutus* Root Extract Gel Containing 0.2% rhinacanthin C

Patamaporn Pruksakorn^{*‡}, Viparut Maititklang[†], Maskiet Boonyareth[†], Pornsri Prasertwaree^{*}

^{*} Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Talad Khwan Subdistrict, Mueang Nonthaburi District, Nonthaburi Province 11000

[†] Laboratory of Animal Center, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Talad Khwan Subdistrict, Mueang Nonthaburi District, Nonthaburi Province 11000

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

Abstract

Introduction and Objective: *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz, commonly known as snake jasmine or Thong-Phan-Chang in Thai, is a shrub in the Acanthaceae family. This plant is widely distributed across tropical regions, particularly in South-east Asia, South China, and India. In Thai traditional medicine, both the leaves and roots of *R. nasutus* have been used to treat various skin diseases, including eczema, ringworm, and tinea versicolor. The plant exhibits potent antifungal activity against dermatophytes, especially the root, which contains rhinacanthin C, a naphthoquinone compound, as the major antifungal substance. In previous studies, a root extract gel from *R. nasutus* was developed as a topical herbal formulation for treating skin conditions caused by fungal infections. The 0.1% rhinacanthin C gel preparation has been extensively studied, with empirical data supporting its safety in both animal models and humans. However, the safety profile of a higher-concentration formulation, specifically the 0.2% rhinacanthin C gel, has yet to be thoroughly assessed. This study aimed to evaluate the dermal irritation and corrosion responses of the 0.2% rhinacanthin C gel derived from *R. nasutus* root extract in rabbits to obtain preliminary safety data of the formulation prior to conducting a dose-response study in patients.

Methodology: The dried roots of *R. nasutus* were extracted, and the rhinacanthin C content was quantified using

reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The *R. nasutus* root extract was then used as the active ingredient to prepare a 0.2% rhinacanthin C gel. The quality of the gel was later evaluated, including the gel's physical characteristics, the percentage of rhinacanthin C relative to the labeled amount, microbial and heavy metal contamination, and pH, to ensure its suitability for dermal application. The prepared 0.2% rhinacanthin C gel was then subjected to dermal irritation and corrosion testing in accordance with OECD Guideline 404 (OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Irritation/Corrosion). New Zealand White rabbits were used as test animals. The testing process began with the skin corrosion test (initial test), conducted on a single rabbit to observe the dermal response, including erythema and oedema, and to monitor for any signs of skin damage or other adverse reactions. If no corrosion was observed in the initial test, a skin irritation test (confirmatory test) was conducted on two additional rabbits to assess potential irritation further.

Results: The prepared *R. nasutus* root extract gel (0.2% rhinacanthin C) exhibited appropriate physical characteristics and contained rhinacanthin C within the specified concentration (90.0 – 110.0% of the labeled amount). No microbial contamination was detected, and heavy metal contamination did not exceed the limits of Thai Herbal Pharmacopoeia. The formulation had a pH of 5.5. These results confirmed that the gel preparation was suitable for testing acute dermal irritation/corrosion. In the skin corrosion test, no signs of skin damage were observed, indicating that the *R. nasutus* root extract gel (0.2% rhinacanthin C) did not induce skin corrosion. The skin irritation test revealed mean values of 0.67 – 1.00 for erythema and 0 – 0.67 for oedema, both of which met the no irritation requirement (0 to <1.5 non-irritant). These findings suggest that the 0.2% rhinacanthin C gel did not exhibit dermal irritation.

Discussion: Although the 0.2% rhinacanthin C gel did not exhibit significant skin irritation or corrosion, it is important to note that the mean values of erythema and oedema scores were slightly higher than those observed in our previous study using the 0.1% rhinacanthin C gel, which showed mean values of 0.33 – 0.67 for erythema and 0 for oedema. This suggested that formulations containing rhinacanthin C at concentrations above 0.2% might pose an elevated risk of skin irritation.

Conclusion and Recommendation: The *R. nasutus* root extract gel containing 0.2% rhinacanthin C demonstrated no significant skin corrosion or irritation in New Zealand White rabbits in accordance with OECD Guideline No. 404. These findings suggest that the 0.2% rhinacanthin C gel preparation is safe for topical application and is suitable for further clinical trials to evaluate the efficacy and safety in patients with dermatophytosis.

Key words: *Rhinacanthus nasutus* root extract gel, rhinacanthin C, safety, irritation, corrosion

บทนำและวัตถุประสงค์

ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) เป็นสมุนไพรที่พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย จีน และภูมิภาคเอเชียที่มีลักษณะทางภูมิอากาศแบบร้อนชื้น^[1-2] พืชนี้มีสารอินทรีย์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ เช่น naphthoquinones, anthraquinones, flavonoids, benzenoids, glycosides, terpenoids และ sterols^[3] รวมถึงมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ได้แก่ ด้านเชื้อรา^[4-5] ด้านเชื้อแบคทีเรีย^[6] ด้านไวรัส^[7-8] ด้านการอักเสบ^[9-10]

ด้านการแพ้^[11] และบรรเทาปวด^[9] โดยพบสารออกฤทธิ์หลัก คือ ไรนาแคนทิน-ซี (rhinacanthin C) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinones^[4-11]

ในทางการแพทย์แผนไทย ใบทองพันชั่งมีสรรพคุณ ขับพิษไข้ แก้ไข้ตัวร้อน ส่วนรากทองพันชั่งมีสรรพคุณ แก้กกลากเกลื้อน ผื่นคัน และโรคผิวหนังที่เป็นน้ำเหลืองบางชนิด โดยการใช้ทองพันชั่งสำหรับรักษาโรคผิวหนังตามวิธีการดั้งเดิมนั้นจะใช้ใบสดและรากตำให้ละเอียดแช่ในเหล้าโรง แล้วนำตัวยาที่ได้ทำบริเวณที่มีอาการวันละ 2-3 ครั้งจนกว่าจะหาย^[1-2] ซึ่ง

วิธีการนี้ไม่สะดวกต่อการนำไปใช้จริงในชีวิตประจำวัน แม้ว่าปัจจุบันมีการนำทองพันชั่งมาทำเป็น “ยาทิงเจอร์ทองพันชั่ง” ตามบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร ซึ่งทำให้ทองพันชั่งอยู่ในรูปแบบยาที่สะดวกและพร้อมใช้งานมากขึ้น โดยมีข้อบ่งใช้เป็นยาทาแก้กลากเกลื้อน โรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา และน้ำกัดเท้า อย่างไรก็ตาม ตำรับยาดังกล่าวไม่มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ระบุเพียงมีตัวยาลำดับเป็นสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ (70 เปอร์เซ็นต์) ของใบทองพันชั่งสด ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)^[12] ซึ่งการไม่กำหนดปริมาณสารสำคัญอาจทำให้การผลิตยาแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่คงที่ และมีผลต่อประสิทธิผลของยาในการรักษาโรค เนื่องจากใบทองพันชั่งในแต่ละแหล่งปลูกนั้นมีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในระดับที่แตกต่างกัน^[13] นอกจากนี้ ยาในรูปแบบทิงเจอร์จะมีปริมาณแอลกอฮอล์ในตำรับสูง จึงมักก่อให้เกิดการระคายเคืองในบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน ผิวหนังที่มีบาดแผลหรือมีแผลเปิดได้

ด้วยเหตุนี้ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรต้านเชื้อราจากทองพันชั่งในรูปแบบใหม่ขึ้น โดยเลือกใช้สารสกัดจากรากทองพันชั่งซึ่งมีปริมาณสารสำคัญไรนาแคนทิน-ซีสูงกว่าส่วนอื่นของพืชมาเป็นสารสำคัญในตำรับ^[5] และพัฒนาตำรับให้อยู่ในรูปแบบเจลสารสกัดจากรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ทำการทดสอบยืนยันประสิทธิผลในการต้านเชื้อราในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง และทดสอบความปลอดภัยของตำรับ โดยพบว่าไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง และไม่ก่อให้เกิดการแพ้เมื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง^[14] รวมถึงไม่ก่อให้เกิดความ

เป็นพิษทางพันธุกรรม และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองเมื่อทดสอบในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดี ด้วยวิธี single patch test^[15] ซึ่งผลการศึกษาเหล่านี้เป็นข้อมูลเชิงประจักษ์ที่ยืนยันถึงความปลอดภัยของตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดจากรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก สำหรับนำมาใช้ทดสอบประสิทธิผลในการรักษาผู้ป่วยโรคกลาก อย่างไรก็ตาม ตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดจากรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในระดับที่สูงขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดจากรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ยังไม่มีข้อมูลการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อน เพื่อยืนยันความปลอดภัยของตำรับผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสำหรับนำไปใช้ศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยในการรักษาผู้ป่วยโรคกลากในระดับคลินิก เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดจากรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองของตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดจากรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เพื่อยืนยันความปลอดภัยของตำรับ โดยดำเนินการตามข้อกำหนดขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) ตามแนวทางการทดสอบสารเคมี Test No. 404 (OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Irritation/Corrosion) โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White เป็นสัตว์ทดลอง

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

สารเคมี

Sodium CMC, Cremophor RH40, PEG 400, refined glycerin USP grade และ propylene glycol USP grade ใช้สารเคมีชนิด pharmaceutical grade จากบริษัท P.C. Drug Center (กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย); EDTA (Univar Solutions, Washington, USA) methyl paraben, propyl paraben และ trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ethanol, citric acid monohydrate และ tri-sodium citrate dihydrate (Merck, Darmstadt, Germany) โดยใช้สารเคมีชนิด analytical grade; acetonitrile และ methanol ใช้ตัวทำละลายชนิด HPLC grade (J.T. Baker, Maharashtra, India)

ตัวอย่างพืช

รากทองพันชั่งเก็บจากต้นทองพันชั่งที่มาจากต้นพันธุ์ที่เคยตรวจระบุชนิดพันธุ์พืช และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพื่องานวิจัย (Herbarium no. BKF 194241) ที่สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร โดยเก็บรากจากพืชที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน จากอำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี เดือนมีนาคม 2565

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่ง^[14]

สารสกัดรากทองพันชั่งเตรียมจากผงแห้งของรากทองพันชั่งหมักด้วย 95% เอทานอล โดยทำการ

สกัดซ้ำ 2 ครั้ง นำส่วนสารสกัดเอทานอลไประเหยแห้งได้สารสกัดหยาบของรากทองพันชั่ง จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดแยกต่อด้วยน้ำกับเอทิลแอซีเตต นำสารสกัดชั้นเอทิลแอซีเตตไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้สารสกัดรากทองพันชั่งแห้ง เก็บรักษาตัวอย่างสารสกัดในโถแก้วดูดความชื้นจนกระทั่งนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี และเตรียมตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

การเตรียมตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก และการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ

เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ผลิตโดยห้องปฏิบัติการโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร โดยในเจลสารสกัดรากทองพันชั่งมีสารสำคัญคือสารไรนาแคนทิน-ซี 0.2% w/w และส่วนประกอบในตำรับอื่น ๆ ได้แก่ water, PEG400, 95% ethanol, glycerin, propylene glycol, sodium CMC, Cremophor RH40, tri-sodium citrate dehydrate, citric acid monohydrate, EDTA, methylparaben, propylparaben เตรียมโดยนำสารก่อก่อเจล sodium CMC โปรยลงในน้ำ เติม glycerin, polyethylene glycol 400, propylene glycol, paraben concentrate และ EDTA แล้วผสมให้เข้ากัน นำ 95% ethanol และ Cremophor RH40 มาใช้ละลายสารสกัดรากทองพันชั่ง แล้วผสมลงในตำรับยาเตรียม เติมน้ำส่วนที่เหลือลงไปผสมให้เข้ากัน นำตำรับที่เตรียมได้ไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และ pH ของตำรับ รวมถึงส่งตัวอย่าง

ผลิตภัณฑ์ตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีวิเคราะห์ตาม BP 2018^[16] ที่สำนักงานและวัตถุเสพติด และตรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) โดย ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร

การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ด้วยวิธี HPLC^[14]

- การหาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่ง

- การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่ง ดำเนินการตามวิธีการในรายงานการวิจัยของ Pruksakorn et al. (2021)^[14]

- การหาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

วิเคราะห์หาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในตำรับยาเตรียม ดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีการในรายงานการวิจัยของ Pruksakorn et al. (2021)^[14] มีวิธีการคือ เตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยการชั่งตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งน้ำหนัก 1 กรัม นำไปละลายใน 99.9% เอทานอลให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask แล้วต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อเร่งการตกตะกอนของสารก่อเจล และนำไปปั่นที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมากรองผ่าน 0.45 μ m nylon filter ตัวอย่างวิเคราะห์เตรียมโดยผสมสารละลายที่เตรียมข้างต้นกับเมทานอลในอัตราส่วน

1:3 โดยปริมาตร แล้วบรรจุใส่ขวดสำหรับฉีด HPLC และวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ใช้คอลัมน์ชนิด VertiSep UPS C18 HPLC Column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มม. x ความยาว 250 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ประกอบด้วย 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรแอซิดิกในแอซิโตไนโตรล์ และ 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรแอซิดิกในน้ำ ในอัตราส่วน 72:28 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร มีระยะเวลาในการวิเคราะห์ 20 นาที และใช้สารไรนาแคนทิน-ซี ที่มีความเข้มข้น 10, 40, 70, 100, 130 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน ใช้พื้นที่ใต้พีค (area under the curve, AUC) สำหรับคำนวณปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี จากสมการเส้นตรงของกราฟสารมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซี

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อน ด้วยวิธีการตาม OECD Guidelines No.404^[17]

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.2% rhinacanthin C) ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (หมายเลขควบคุมโครงการ 66-009) ใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 6 ตัว ไม่ระบุเพศ ไม่จำกัดอายุ มีน้ำหนักไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม แยกเลี้ยงกระต่ายแต่ละตัวในกรงขนาดมาตรฐาน

(30 × 28 × 19 นิ้ว) การดูแลสัตว์ทดลองเป็นไปตามมาตรการเลี้ยงสัตว์สากล โดยเลี้ยงในสภาวะควบคุมที่อุณหภูมิที่ 20 ± 3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30 - 70% มีระยะเวลาการให้แสงสว่าง 12:12 ชั่วโมง และให้สัตว์กินอาหารและน้ำอย่างไม่จำกัดปริมาณ เลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนการทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วัน การทดสอบใช้กระต่าย 3 ตัว ที่มีสุขภาพชนและผิวหนังดี กระต่าย 3 ตัวที่เหลือใช้เป็นสัตว์ทดลองสำรอง การทดสอบใช้ตัวอย่างทดสอบเป็นเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง 0.5 กรัม และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเป็นตัวอย่างควบคุม ก่อนเริ่มทำการทดสอบ 24 ชั่วโมง โกงชนกระต่ายบริเวณหลังกระต่ายด้วยเครื่องโกนไฟฟ้า การแปะตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุม ทำโดยทาตัวอย่างลงบนตำแหน่งทดสอบที่บริเวณหลังกระต่าย แล้วปิดทับด้วยแผ่นผ้าก๊อซ (absorbent gauze patch) ขนาด 2.5×2.5 เซนติเมตร

การทดสอบขั้นต้น (initial test) เป็นการทดสอบการกัดกร่อนผิวหนัง (skin corrosion test) ใช้กระต่าย 1 ตัว โดยการทาตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุมนาน 3 นาที แล้วอ่านผลการทดสอบ หากไม่มีอาการทางผิวหนังให้ทดสอบขั้นถัดไป โดยทำการทาตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุมในตำแหน่งใหม่นาน 1 ชั่วโมง เอาแผ่นปิดทับตัวอย่างออกแล้วอ่านผลการทดสอบ หากไม่มีอาการทางผิวหนัง ให้ทาตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุมในตำแหน่งใหม่นาน 4 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการทดสอบอีก 4 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 1, 24, 48 และ 72 หลังเอาแผ่นปิดทับตัวอย่างออก ให้คะแนนระดับการเกิดรอยแดง

(erythema) และบวม (oedema) บริเวณทดสอบ 0 ถึง 4 คะแนน โดยมีรายละเอียดเกณฑ์การให้คะแนนปฏิกิริยาทางผิวหนัง ตาม OECD Guidelines No. 404^[17] สังเกตสุขภาพสัตว์และประเมินผลการกัดกร่อน โดยหากพบปฏิกิริยาการกัดกร่อนบริเวณที่ทาตัวอย่างทดสอบ เช่น เนื้อตาย (necrosis) แผลหลุม (ulcer) เลือดไหล (bleeding) สะเก็ดแผล (bloody scabs) จะให้สิ้นสุดการทดสอบทันที หากไม่พบการกัดกร่อน จะสังเกตอาการสัตว์ต่ออีก 14 วัน หลังเอาแผ่นปิดทับออก หากพบว่าผิวหนังเปลี่ยนไป หรือสีซีดลง มีภาวะขนร่วงและแผลเป็น หรือมีความผิดปกติที่ผิวหนัง (skin problems) ที่บ่งบอกว่าเป็นความเสียหายทางผิวหนังที่ไม่สามารถกลับคืนสู่ปกติ จะสรุปว่าตัวอย่างทดสอบมีคุณสมบัติการกัดกร่อน ประเมินผลการระคายเคืองโดยสังเกตการบวมหรือแดงตามระยะเวลาที่ทดสอบ กรณีพบความผิดปกติที่ผิวหนังให้ติดตามสุขภาพสัตว์ต่ออีก 14 วัน เพื่อดูว่าความผิดปกติที่ผิวหนังที่เกิดขึ้นสามารถกลับสู่ปกติได้หรือไม่

การทดสอบยืนยัน (confirmatory test) สำหรับการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง (skin irritation test) จะใช้กระต่าย 2 ตัว โดยการทาตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุมนาน 4 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการทดสอบอีก 4 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 1, 24, 48 และ 72 หลังเอาแผ่นปิดทับตัวอย่างออก ให้คะแนนระดับการเกิดรอยแดงและบวมบริเวณทดสอบ และสัตว์ทดลองจะถูกสังเกตอาการต่ออีก 14 วัน นอกจากนี้ สังเกตสุขภาพสัตว์ทดลองนอกเหนือจากความผิดปกติที่ผิวหนัง ได้แก่ น้ำหนักสัตว์ทดลอง การกินอาหารและน้ำ อัตราการตาย อาการแสดงออกหรือ

พฤติกรรมที่ผิดปกติ รวมถึงอาการไม่พึงประสงค์ที่ส่งผลกระทบต่อร่างกาย (systemic adverse effects) ในสัตว์ทดลองทั้ง 3 ตัว หลังสิ้นสุดการทดสอบทำการุณยฆาตสัตว์ทดลองโดยใช้ thiopental sodium ขนาด 200 มก./กก./ตัว

คำนวณผลการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง โดยนำข้อมูลการสังเกตเฉพาะที่เวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ในสัตว์ทดลองทั้ง 3 ตัว มาคำนวณคะแนนเฉลี่ยของการแดงหรือบวม

สมการ

$$\text{Mean value of [erythema/oedema]} = \frac{\text{Sum of [erythema/oedema] grades at 24, 48 \& 72 hrs}}{3}$$

ผลการศึกษา

การเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่ง

การเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่งสำหรับผลิตตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง เตรียมสารสกัดได้ปริมาณ 44.53 กรัม เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธี HPLC โดยวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง พบว่าสารสกัดรากทองพันชั่งมีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างอยู่ที่ $63.26 \pm 2.00\%$ โดยน้ำหนัก

การเตรียมตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก

โดยค่าเฉลี่ยของการแดงหรือบวมในสัตว์แต่ละตัว คำนวณจากผลรวมของการแดงหรือบวม ทารด้วย 3 ดังสมการ และแปลผลการทดสอบการระคายเคืองตามเกณฑ์การพิจารณา skin irritant category and subclass ในเอกสาร OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 33 (Chapter 2.2: Harmonised system for the classification of chemicals which cause skin irritation/corrosion)^[18]

นำสารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมได้ข้างต้นมาผลิตตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก โดยขนาดการผลิต 6 กิโลกรัม ดำเนินการผลิตผลิตภัณฑ์ ณ โรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร และนำตำรับที่ผลิตขึ้นไปวิเคราะห์คุณภาพ โดยตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและวัดค่า pH ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก และตรวจหาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในตำรับยาเตรียม มีผลการวิเคราะห์คุณภาพดังแสดงใน Table 1

Table 1 Quality control of *Rhinacanthus nasutus* root extract gel (0.2% rhinacanthin C)

Test Parameter	Specification	Result
Description	Honey–orange gel with characteristic odor	Pass
Identification	Not less than 90.0 % and not more than 110.0 % of the labeled amount of rhinacanthin C (0.2 % w/w)	99.8 ± 2.2% of labeled amount
Microbial limit test		
– Total aerobic microbial count	$\leq 2 \times 10^2$ CFU/g	Less than 10 CFU/g
– Total combined yeasts and moulds count	$\leq 2 \times 10^1$ CFU/g	Less than 10 CFU/g
– <i>Staphylococcus aureus</i>	Absence/g	Absence/g
– <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence/g	Absence/g
– <i>Clostridium spp.</i>	Absence/g	Absence/g
Heavy metals		
– Arsenic	≤ 4 ppm	Absence/ g
– Cadmium	≤ 0.3 ppm	0.039 ppm
– Lead	≤ 10 ppm	Absence/ g
– Mercury	≤ 0.5 ppm	Absence/ g
pH	5.4–5.9	5.5

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยวิธีทดสอบตาม OECD Guidelines No. 404

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง ใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White เพศเมีย 3 ตัว มีน้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดสอบ 2.503 - 3.194 กิโลกรัม ในการทดสอบขั้นต้นสำหรับการทดสอบการกัดกร่อนผิวหนังในกระต่าย No. 1 หลังการแปะตัวอย่างทดสอบเจลสารสกัดรากทองพันชั่งและตัวอย่างควบคุม 3 นาที ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง และหลังจากแปะตัวอย่างทดสอบเจล

สารสกัดรากทองพันชั่งและตัวอย่างควบคุมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการทดสอบพบการแดงน้อยมาก (very slight erythema) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงผิวหนังที่แสดงให้เห็นถึงความเสียหายหรือการตายของผิวหนัง เมื่อติดตามอาการของสัตว์ทดลองต่อเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าผิวหนังบริเวณที่ทำการทดสอบกลับมามีลักษณะปกติดังแสดงใน Table 2 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารโรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อให้เกิดการกัดกร่อน

Table 2 Skin corrosion result of rabbit No. 1

Contact time	Skin lesion	14 days observation
≤ 3 minutes	Not found	Normal
> 3 minutes – < 1 hour	Very slight erythema	Normal
> 1 hour – < 4 hours	Very slight erythema	Normal

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนังในกระต่ายทั้ง 3 ตัว มีผลคะแนนเฉลี่ยของการแดงหรือบวม ดังแสดงใน Table 3 การติดตามสุขภาพของกระต่ายตลอดการศึกษา พบว่ากระต่ายทุกตัวมีสุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์ น้ำหนักตัวขึ้นตามปกติ ยกเว้นกระต่าย 1 ตัว ที่มีน้ำหนักตัวลดลงเล็กน้อยในช่วงของการทดสอบ ซึ่งอาจเกิดจากภาวะเครียดระหว่างการทำการศึกษา แต่ในช่วงอื่น ๆ กระต่ายทุกตัวมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นทุกระยะของการทดสอบ สามารถกินอาหารและน้ำได้ดีเป็นปกติ ไม่พบการป่วย-ตาย

หรือพฤติกรรมที่ผิดปกติ และไม่พบความผิดปกติที่ผิวหนังและการกัดกร่อน เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยของการแดงในสัตว์แต่ละตัวอยู่ที่ 0.67 - 1.00 และมีค่าเฉลี่ยของการบวมในสัตว์แต่ละตัว อยู่ที่ 0 - 0.67 คือคะแนนการระคายเคืองทางผิวหนังอยู่ในช่วง 0 ถึง <1.5 สามารถแปลผลได้ว่า เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อการระคายเคือง/การกัดกร่อนผิวหนังกระต่าย (non-irritant) ดังแสดงใน Table 4

Table 3 Skin irritation results

Rabbit details				Scoring at				Sum of the score*	Mean value
Animal No.	Weight (kg.)	Item	Skin lesion	1 hr.	24 hr.	48 hr.	72 hr.		
1	2.503	Test Item	Erythema	0	1	1	0	2	0.67
			Oedema	0	0	0	0	0	0
		Control	Erythema	0	0	0	0	0	0
			Oedema	0	0	0	0	0	0
2	2.706	Test Item	Erythema	1	1	1	0	2	0.67
			Oedema	0	0	0	0	0	0
		Control	Erythema	0	0	0	0	0	0
			Oedema	0	0	0	0	0	0
3	3.194	Test Item	Erythema	1	1	1	1	3	1.00
			Oedema	0	1	1	0	2	0.67
		Control	Erythema	0	0	0	0	0	0
			Oedema	0	0	0	0	0	0

* Summation of the score at 24, 48 and 72 hours.

Test Item: Rhinacanthus nasutus root extract gel (0.2% rhinacanthin C)

Control: Sterile filtered water

Table 4 Skin irritation interpretation

Classification	Score	Skin irritation category	
No irritation	0 – < 1.5	Non-irritant	
Mild irritation (level 3) 2 of 3 animals	≥ 1.5 – < 2.3	Mild irritant (Category 3)	
Irritation (level 2) 2 of 3 animals	≥ 2.3 – < 4.0	Irritant (Category 2)	
Test results	Mean value at 24, 48, and 72 hrs.		
Animal No.	No. 1	No. 2	No. 3
Mean value of erythema/eschar	0.67	0.67	1.00
Mean value of oedema	0.00	0.00	0.67
Summary of findings	Rabbit No. 1 had a mean value of 0.67 for erythema, and no oedema was found. Rabbit No. 2 had a mean value of 0.67 for erythema, and no oedema was found. Rabbit No. 3 had a mean value of 1.00 for erythema and a mean value of 0.67 for oedema.		
Interpretation	The mean value of erythema/oedema in the three tested rabbits met the non-irritant category (0 – < 1.5). The Rhinacanthus nasutus root extract gel (0.2% rhinacanthin C) did not cause dermal irritation.		

อภิปรายผล

การเตรียมเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรรินาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ในโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรพบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้มีปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญไรรินาแคนทิน-ซี อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ร้อยละ 90.0 - 110.0 ของปริมาณที่ระบุในสูตรตำรับ) มีลักษณะทางกายภาพและค่า pH 5.5 ตรงตามลักษณะที่ต้องการ รวมถึงมีผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (microbial limit test) และการตรวจการปนเปื้อนโลหะหนักอยู่ในปริมาณที่กำหนดตามเกณฑ์การยอมรับของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2019^[19] ดังนั้น เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรรินาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2

โดยน้ำหนัก ที่เตรียมได้นี้จึงมีคุณภาพตรงตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

ตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง จัดเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรประเภทยาจากสมุนไพรที่วิจัยพัฒนา (scientifically established herbal medicines) (ข3) หมายถึง ยาจากสมุนไพร ยาตามองค์ความรู้แพทย์ทางเลือกอื่นที่นอกเหนือจากประกาศกำหนด ที่ต้องอาศัยข้อมูลทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนเช่นข้อมูลที่ไม่ใช่การศึกษาทางคลินิกการศึกษาวิจัยทางคลินิก ข้อมูลจากการสำรวจทางวิชาการ ร่วมกับข้อมูลตามองค์ความรู้ที่สืบทอดต่อกันมา^[20] อย่างไรก็ตาม จากประวัติการใช้แบบดั้งเดิมที่อ้างอิงถึงการใช้รากทองพันชั่งสำหรับรักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา ไม่สามารถประเมินขนาดการใช้ที่เหมาะสมของราก

ทองพันชั่งในผลิตภัณฑ์ได้ แม้ว่าตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ได้มีการทดสอบยืนยันถึงประสิทธิผลในการต้านเชื้อราในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง^[14] รวมถึงมีผลการศึกษายืนยันด้านความปลอดภัยทั้งในระดับพรีคลินิกและคลินิกแล้ว โดยเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกีดกร่อน และไม่ก่อให้เกิดการแพ้เมื่อทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษทางพันธุกรรม และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองเมื่อทำการทดสอบในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี single patch test^[14-15] ซึ่งเป็นข้อมูลเชิงประจักษ์ด้านความปลอดภัยของตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่จะนำไปใช้ทดสอบประสิทธิผลของตำรับในการรักษาผู้ป่วยโรคกลากได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม สำหรับตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ในระดับที่สูงขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ยังไม่มีข้อมูลการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกีดกร่อน เพื่อยืนยันความปลอดภัยของตำรับผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสำหรับนำไปใช้ศึกษา dose response ของประสิทธิผลในการรักษาผู้ป่วยโรคกลากในระดับคลินิก ในการศึกษาจึงได้ทำการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกีดกร่อนในสัตว์ทดลองของตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก (0.2% rhinacanthin C) ตามวิธีการที่อ้างอิงตาม OECD Guidelines No.404 เพื่อ

ยืนยันความปลอดภัยของตำรับ

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกีดกร่อนในสัตว์ทดลองของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าตำรับเจลดังกล่าว ไม่มีฤทธิ์ในการกีดกร่อนและไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองทางผิวหนัง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบนี้กับผลการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกีดกร่อนในสัตว์ทดลองของตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ซึ่งทดสอบด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยของการแดงในสัตว์แต่ละตัวอยู่ที่ 0.67 - 1.00 และมีค่าเฉลี่ยของการบวมในสัตว์แต่ละตัว อยู่ที่ 0 - 0.67 ซึ่งสูงกว่าผลการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกีดกร่อนในสัตว์ทดลองของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่มีค่าเฉลี่ยของการแดงในสัตว์แต่ละตัวอยู่ที่ 0.33 - 0.67 และมีค่าเฉลี่ยของการบวมในสัตว์แต่ละตัวอยู่ที่ 0^[15] จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระดับสารไรนาแคนทิน-ซี ในตำรับที่สูงขึ้นมีผลต่อค่าเฉลี่ยของการแดงและการบวม ดังนั้นตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน-ซี ที่สูงกว่าร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก มีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนังได้

ข้อสรุป

การศึกษานี้ ได้ผลิตตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ร้อยละ 0.2

โดยน้ำหนัก ในโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร และตรวจวิเคราะห์คุณภาพของตำรับผลิตภัณฑ์ให้ตรงตามเกณฑ์มาตรฐาน โดยเจลาซาร์สกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซีร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ที่เตรียมได้มีปริมาณสารสำคัญไรนาแคนทิน-ซี เท่ากับ 99.8% labeled amount ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนด (90.0 - 110.0% ของปริมาณที่ระบุในสูตรตำรับ) ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และการปนเปื้อนโลหะหนัก พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2019 เมื่อนำตำรับไปทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อน ในสัตว์ทดลองด้วยวิธีตาม OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test No. 404 พบว่าตำรับเจลาซาร์สกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซีร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง และไม่พบการกัดกร่อน จึงมีความปลอดภัยสำหรับนำไปศึกษาในระดับคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิผลและความปลอดภัยของตำรับในการรักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังจากเชื้อรา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการให้ทุนสนับสนุนการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- Thiangburanathum W. Dictionary of Thai Medicinal Plants. 5th ed. Bangkok: Aksornpittaya; 1999. (in Thai)
- Thailand Association of Traditional Medicine School Wat Phra Chetuphon (Wat Pho) Tha Thien Pranakorn. Handbook of Thai pharmacist Drug Act B.E. 2510 and ministerial regulation. 2nd ed. Bangkok: Ampolpittaya; 1969. (in Thai)
- Bukke S, PS R, GS, Kedam TR. The study on morphological, phytochemical and pharmacological aspects of *Rhinacanthus nasutus*. (L) Kurz (A Review). J App Pharm Sci. 2011;1(8):26-32.
- 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.
- Pruksakorn P, Jaima C, Panyajai P, Mekha N, Autthatein-chai R, Dhepakson P. Antifungal activity of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz extract against dermatophytes. J Thai Trad Alt Med. 2018;16(2):205-17. (in Thai)
- 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 J Pharm Sci. 2006;33(1-4):15-22. (in Thai)
- Ebdu A, Chen JL, Jolad SD, 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.
- Thongchuai B, Tragoolpua Y, Sangthong P, Trisuwan K. Antiviral carboxylic acids and naphthoquinones from the stems of *Rhinacanthus nasutus*. Tetrahedron Lett. 2015;56(37):5161-3. (in Thai)
- 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. Sonklanakarin J Sci Technol. 2014;36(3):325-31. (in Thai)
- 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. (in Thai)
- Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Anti-allergic principles of *Rhinacanthus nasutus* leaves. Phytomedicine. 2009;16:929-34. (in Thai)
- 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)
- Pruksakorn P, Jaima C, Panyajai P, Onthong S, Sriboran S. Variation of rhinacanthin C content in the raw materials of *Rhinacanthus nasutus*. Int J Pharm Res Appl. 2024;9(3):865-8. (in Thai)

14. Pruksakorn P, Jaima C, Sumateewatanakul V, Sa-nguanruang W, Panyajai P, Autthateinchai R, Mekha N, Sachanonta N, Dhepakson P. Development and evaluation of *Rhinacanthus nasutus* root extract gel as an antifungal for the treatment of dermatophytosis. J Thai Trad Alt Med. 2021;19(2):435-57. (in Thai)
15. Pruksakorn P, Jaima C, Suppajariyawat P, Sumateewatanakul V, Larpardisorn K, Tongkamsen C, Pimpapai W, Rojanawiwat A, Akrachalanont P. Safety evaluation of *Rhinacanthus nasutus* root extract gel. J Thai Trad Alter Med. 2023;21(2):307-26. (in Thai)
16. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2018. London: TSO; 2017.
17. OECD guideline for testing of chemicals. Acute dermal irritation/corrosion. [Internet]. 2015 [cited 2024 December 6]; [8 pages]. Available from: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_9789264242678-en.html
18. Organisation for Economic Co-operation and Development. Chapter 2.2: Harmonised system for the classification of chemicals which cause skin irritation/corrosion. In: OECD series on testing and assessment Number 33. Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures. [Internet]. 2001 [cited 2024 December 6]; [249 pages]. Available from: https://www.oecd.org/en/publications/2002/05/harmonised-integrated-classification-system-for-human-health-and-environmental-hazards-of-chemical-substances-and-mixtures_g1gh2b6c.html
19. 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; 2019.
20. Herbal product division, Thai Food and Drug Administration. Type of Herbal Products. [Internet]. 2023 [cited 2024 December 6]; [75 pages]. Available from: https://www.fda.moph.go.th/Herbal/SitePages/Document/product/3.product_allow.pdf