

การประเมินความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมจาก โรงงานต้นแบบ

ปฐมมาพร ปรีกษากร^{*§}, จัตุรภรณ์ ใจมา[†], พรวรา ศุภจริยาวัตร^{*}, วิรัตน์ สุเมธวิวัฒนกุล[‡], คณิศร ลาภอดิสร[†],
ชญาดา ทองคำแสง[†], วรางลักษณ์ พิมพ์ภักย์[†], อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์[‡], พิลาสลักขณ์ อัครชลานนท์^{*}

^{*}สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

[†]สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

[‡]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

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

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) เป็นตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่พัฒนาขึ้นภายใต้ผลการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ร่วมกับการใช้องค์ความรู้ในทางการแพทย์แผนโบราณของไทย เพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับใช้ภายนอกที่มีคุณภาพและมีสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา อย่างไรก็ตาม การพัฒนาสมุนไพรให้อยู่ในรูปแบบใหม่ควรมีการศึกษาความปลอดภัยของตำรับก่อนนำไปใช้ในมนุษย์การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อประเมินความปลอดภัยของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ทดลองผลิตในโรงงานต้นแบบ

วิธีการศึกษา: ประเมินความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง โดยทำการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทดสอบตามแนวทางขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา หมายเลข 471 (OECD Guideline No. 471) ทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองด้วยวิธีทดสอบตามแนวทางขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา หมายเลข 404 (OECD Guideline No. 404) และศึกษาความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งโดยการทดสอบการระคายเคืองในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี Single patch test การทดลองในสัตว์ผ่านการพิจารณาและอนุมัติด้านจริยธรรมจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสหมายเลข 63-031 (62-018) การทดลองในคนได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัส 4/2563

ผลการศึกษา: ตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียที่ทำการศึกษาทุกสายพันธุ์ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลอง และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนังของอาสาสมัคร

อภิปรายผล: ตำรับสารสกัดทองพันชั่งนี้จัดเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรประเภทวิจัยพัฒนา (ข3) ต้องมีข้อมูลด้านความปลอดภัยและประสิทธิผลเพิ่มเติม นอกเหนือจากองค์ความรู้ดั้งเดิมในการขออนุญาตผลิตและจำหน่าย ทั้งผลการศึกษาในห้องทดลอง สัตว์ทดลอง และในมนุษย์ โดยต้องทดสอบการก่อกลายพันธุ์ การกัดกร่อน และการระคายเคืองต่อผิวหนังตามมาตรฐานสากล การศึกษานี้ได้ดำเนินการตามมาตรฐานทั้งการเตรียมเจลสารสกัด การทดสอบในสัตว์ และในมนุษย์ ซึ่งพบว่าสารสกัดที่ทดสอบไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษทางพันธุกรรม ไม่มีผลกัดกร่อนผิวหนัง และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองทางผิวหนังทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่พัฒนาที่มีความปลอดภัยสำหรับนำไปใช้ในมนุษย์ สามารถนำไปใช้ศึกษาในระดับคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิผลและความปลอดภัยของตำรับในการรักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังจากเชื้อราได้ต่อไป

คำสำคัญ: เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง, ความปลอดภัย, การระคายเคือง, การกัดกร่อน, การกลายพันธุ์

Safety Evaluation of *Rhinacanthus nasutus* Root Extract Gel Prepared from a Pilot Plant

Patamaporn Pruksakorn^{*‡}, Chattraporn Jaima[†], Praw Suppajariyawat^{*}, Virat Sumateewanakul[‡], Kanidsorn Larpdisorn[†], Chayada Tongkamsen[†], Warangluk Pimpapai[†], Archawin Rojanawiwat[‡], Pilaslak Akrachalanont^{*}

^{*} Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Talat Khwan Sub-District, Muang District, Nonthaburi 11000, Thailand

[†] Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Talat Khwan Sub-District, Muang District, Nonthaburi 11000, Thailand

[‡] National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Talat Khwan Sub-District, Muang District, Nonthaburi 11000, Thailand

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

Abstract

Introduction and Objective: *Rhinacanthus nasutus* (commonly known as *thong phan chang* in Thai) root extract gel preparation, containing 0.1% rhinacanthin C, is an herbal product that was developed as an effective topical agent for fungal skin infection using knowledge from both scientific research and Thai traditional medicine. However, the safety of a novel herbal preparation should be assessed before it is approved for use in humans. This study aimed to evaluate the safety of *R. nasutus* root extract gel preparation prepared in a pilot plant.

Methodology: Safety study of *R. nasutus* root extract gel was conducted following the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines, including the bacterial reverse mutation test (Test Guideline 471) and the acute dermal irritation/corrosion test (Test Guideline 404). Skin irritation testing in healthy Thai volunteers was performed using a single patch test. Animal experiments were reviewed and approved ethically by Institutional Animal Care and Use Committee of the Department of Medical Sciences, code number 63-031 (62-018). Human experiments were approved by Research Ethic Committee, Department of Medical Sciences Code 4/2563

Results: Topical preparation of *R. nasutus* root extract was not found to cause any mutations in bacteria, nor did it irritate or corrode the animal skin. Moreover, it did not cause any skin (Test Guideline 404). reactions in healthy volunteers during the single patch test.

Discussion: *R. nasutus* root extract gel preparation, containing 0.1% rhinacanthin C, is categorized as an herbal product derived from research and development beyond traditional knowledge. Thus, the product needs safety and efficacy data from animal models and humans for product registration. In order to study the safety profile of the product according to international standards, the results suggest the *R. nasutus* root extract gel had non-genotoxic and non-skin corrosive effects, nor did it cause dermal irritation in both animal models and humans.

Conclusion and Recommendation: *R. nasutus* root extract gel preparation is deemed to be safe for humans and we can further proceed to clinical trials for efficacy and safety evaluations in patients with fungal skin infections.

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

บทนำและวัตถุประสงค์

ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae พบได้ในบางส่วนของประเทศอินเดีย จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และภูมิภาคเอเชียที่มีลักษณะทางภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทางกรมแพทย์แผนไทยโบราณทองพันชั่งมีสรรพคุณ ขับพิษไข้ แก้ไข้ตัวร้อน และรากทองพันชั่งมีสรรพคุณแก้กลากเกลื้อน ผื่นคัน และโรคผิวหนังที่เป็นน้ำเหลืองบางชนิด^[1-2] พืชนี้มีสารหลากหลายชนิดเป็นองค์ประกอบทางเคมี เช่น สารกลุ่ม naphthoquinones, anthraquinones, flavonoids, benzenoids, glycosides, terpenoids และ sterols^[3] นอกจากนี้ทองพันชั่งยังมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ต้านรา^[4-5] ต้านแบคทีเรีย^[6] ต้านไวรัส^[7-8] ต้านการอักเสบ^[9-10] บรรเทาปวด^[9] และต้านการแพ้^[11] โดยมีสารออกฤทธิ์เป็นสารในกลุ่ม naphthoquinones และมีสารออกฤทธิ์หลัก คือ ไรนาแคนทิน ซี (rhinacanthin C)^[4-11]

สารสกัดทองพันชั่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราหลากหลายชนิด เช่น เชื้อยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Malassezia furfur* และ *M. globosa* เชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ (dermatophytes) ได้แก่ *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, และ *Epidermophyton floccosum* รวมถึงเชื้อราในกลุ่มที่ไม่ใช่เดอร์มาโตไฟต์ (non-dermatophytes) ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *Penicillium chrysogenum*^[5,12-14] โดยพบว่าสารสกัดใบทองพันชั่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal activity) กลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูงกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยสารสกัดไปมีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อทำให้เกิดความผิดปกติของ

เยื่อหุ้มเซลล์ รูปร่างของเซลล์ผิดปกติ แบน และยุบตัวลง ส่งผลให้เกิดเซลล์ตาย^[12] จากรายงานการศึกษาเหล่านี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดทองพันชั่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคกลาก^[5] และต้านเชื้อ *Malassezia* sp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเกลื้อน^[14] รวมถึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อราที่ผิวหนัง (cutaneous fungal infections) ชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *C. albicans*, *C. tropicalis*, *A. niger* และ *P. chrysogenum*^[12-13] ซึ่งฤทธิ์ต้านเชื้อราดังกล่าวนี้สนับสนุนการใช้ทองพันชั่งตามตำราแพทย์แผนโบราณของไทยเพื่อการรักษาโรคผิวหนัง กลาก และเกลื้อน โดยการใช้ทองพันชั่งตามวิธีการดั้งเดิมนั้นจะใช้ใบสดและรากตำให้ละเอียดแช่ในเหล้าโรง แล้วนำตัวยาที่ได้ทาบริเวณที่มีอาการวันละ 2-3 ครั้ง จนกว่าจะหาย^[1-2] ซึ่งวิธีการนี้นับว่ายังคงไม่สะดวกต่อการนำไปใช้จริงในชีวิตประจำวัน

ปัจจุบันมีการนำทองพันชั่งมาทำเป็นยาในรูปแบบ “ยาทิงเจอร์ทองพันชั่ง” ซึ่งยาดังกล่าวนี้ได้บรรจุอยู่ในบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ โดยมีข้อบ่งใช้เป็นยาทาแก้กลาก เกลื้อน โรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา และน้ำกัดเท้า ทำให้ทองพันชั่งอยู่ในรูปแบบยาที่สะดวกและพร้อมใช้งานมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ตำรับยาดังกล่าวไม่มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ ระบุเพียงมีตัวยาสาคัญเป็นสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ (70 เปอร์เซ็นต์) ของใบทองพันชั่งสด ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)^[15] ซึ่งการไม่กำหนดปริมาณสารสำคัญอาจทำให้การผลิตยาแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่คงที่ และมีผลต่อประสิทธิภาพของยาในการรักษาโรค นอกจากนี้ยาในรูปแบบทิงเจอร์จะมีปริมาณแอลกอฮอล์ในตำรับสูง จึงมักก่อให้เกิดการระคายเคืองในบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน ผิวหนังที่มีบาดแผลหรือมีแผลเปิด และการใช้สารสกัดจาก

ใบทองพันชั่งสดทำให้มีสารสีเขียวของคลอโรฟิลล์ปนอยู่ในตำรับ ซึ่งสารสีดังกล่าวนี้เปื้อนเสื้อผ้าได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยนี้จึงพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรต้านเชื้อราจากทองพันชั่ง โดยเลือกใช้สารสกัดจากส่วนรากทองพันชั่งซึ่งมีปริมาณสารสำคัญ ไรโนแคนทิน ซี สูงกว่าส่วนอื่นของพืชมาเป็นส่วนประกอบในตำรับ^[5] พัฒนาตำรับในระดับห้องปฏิบัติการให้อยู่ในรูปแบบเจลที่มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญชัดเจน โดยให้ตำรับมีปริมาณสารไรรโนแคนทิน ซี ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ซึ่งตำรับดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา ไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ในสัตว์ทดลอง เมื่อทำการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10933-10: 2010 นอกจากนี้ ตำรับผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ได้ มีปริมาณแอลกอฮอล์ในตำรับลดลง และไม่มีสารสีเขียวของคลอโรฟิลล์ปนอยู่ในตำรับ^[16]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความปลอดภัยของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่พัฒนาขึ้น โดยทดลองเพิ่มขนาดการผลิตตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในโรงงานต้นแบบ ตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพของตำรับ และนำตำรับไปทดสอบความปลอดภัยตามข้อกำหนดขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) ได้แก่ การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรีย (OECD Guideline for Testing of Chemical: Bacterial Reverse Mutation Test) Test No. 471 และ การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลอง (OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Irritation/Corrosion) Test No. 404 รวมถึงศึกษาความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพัน

ชั่งโดยการทดสอบการระคายเคืองในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี Single patch test

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 สารเคมี

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

Oxid nutrient broth No.2 ได้จากบริษัท Oxoid Limited (Hampshire, UK) Volgel-Bonner medium E และ S9 enzyme ได้จากบริษัท Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) Cofactor-I ได้จากบริษัท Oriental yeast Co. LTD. (Tokyo, Japan) agar และ sodium chloride ได้จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany) Luria broth, glucose, L-histidine, D-biotin, tryptophan, crystal violet, ampicillin, mitomycin, 2-nitrofluorene, sodium azide, acridine mutagen ICR191, 4-nitroquinoline-N-oxide, 4-nitro-o-

phenylenediamine และ 2-aminoanthracene ได้จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

1.2 ตัวอย่างพืช

รากทองพันชั่งเก็บจากต้นทองพันชั่งที่มาจากต้นพันธุ์ที่เคยตรวจระบุชื่อชนิดพันธุ์พืช และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ่างอิงเพื่องานวิจัย (Herbarium no. BKF 194241) ที่สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร โดยเก็บรากจากพืชที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน จากอำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี เดือนกันยายน 2562

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่ง^[16]

รากทองพันชั่งสดนำมาล้างเพื่อกำจัดเศษดินที่ติดรากด้วยน้ำสะอาด และคัดแยกสิ่งปนเปื้อนออก จากนั้นนำมาผึ่งในที่ที่แห้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและบดให้มีขนาดเล็กกว่า 2 มิลลิเมตรหรือสามารถผ่านร่อนขนาด 10 mesh ได้ นำผงรากแห้งไปหมักด้วย เอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1 กรัมของสมุนไพรแห้งต่อเอทานอล 20 มิลลิตร เป็นระยะเวลามากกว่า 16 ชั่วโมง และสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก 15 นาที โดยทำการสกัดตามขั้นตอนข้างต้นซ้ำ 2 ครั้ง กรองและนำส่วนเอทานอลไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 37°C. ได้สารสกัดหยาบของรากทองพันชั่ง จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดแยกต่อด้วยน้ำกับเอทิลเอซีเตต นำสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเตตไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 37°C. ได้สารสกัดรากทองพันชั่งแห้ง และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง เก็บรักษาตัวอย่างสารสกัดในโถแก้วดูดความชื้น (desiccator) จนกระทั่งนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี และเตรียมตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่ง^[16]

การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยวิธี RP-HPLC ใช้เครื่อง HPLC-PDA และใช้คอลัมน์ VertiSep UPS C₁₈ HPLC Column (Thailand) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. × ความยาว 250 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรเอซีติกในแอซีโตไนโตรล และ 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรเอซีติกในน้ำ อัตราส่วน 75:25 อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในสารสกัดรากทองพันชั่งวิเคราะห์โดยใช้สารละลายสารสกัดรากทองพันชั่งในเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร โดยวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดละ 3 ครั้ง และใช้พื้นที่ใต้พีคคำนวณปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี จากสมการเส้นตรงของกราฟสารมาตรฐานไรนาแคนทิน ซี ที่มีความเข้มข้นในช่วงการวิเคราะห์ 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

2.3 การเตรียมตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1%^[16]

เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ผลิตโดยห้องปฏิบัติการโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร โดยในเจลสารสกัดรากทองพันชั่งมีสารสำคัญคือสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% w/w และส่วนประกอบในตำรับอื่นๆ ได้แก่ water, PEG400, 95% ethanol, glycerine, propylene glycol, sodium CMC, Cremophor RH40, tri-sodium citrate dehydrate, citric acid monohydrate, EDTA, methylparaben,

propylparaben มีวิธีการเตรียมคือนำสารก่อเจลง sodium CMC โปรยลงในน้ำ จากนั้นเติม glycerin, polyethylene glycol 400, propylene glycol, paraben concentrate และ EDTA แล้วผสมให้เข้ากัน นำ ethanol และ Cremophor RH40 มาใช้ละลายสารสกัดรากทองพันชั่งแล้วใส่ลงในตำรับยาเตรียม เติมน้ำส่วนที่เหลือลงไปผสมให้เข้ากัน นำตำรับที่เตรียมได้ไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และ pH ของตำรับ รวมถึงวิเคราะห์หาปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในตำรับยาเตรียม ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และตรวจสอบการปนเปื้อนจากโลหะหนักในตำรับ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในเจลงสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยวิธี RP-HPLC^[16]

การหาปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ในตำรับเจลงสารสกัดรากทองพันชั่งใช้วิธี RP-HPLC โดยเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยการชั่งตำรับเจลงสารสกัดรากทองพันชั่งน้ำหนัก 1 กรัม นำไปละลายในเอทานอล 99.9% ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask แล้วต้มที่อุณหภูมิ 50 °C. เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C. เพื่อเร่งการตกตะกอนของสารก่อเจลงเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมากรองผ่าน 0.45 µm nylon filter การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดจะผสมสารละลายที่เตรียมข้างต้นกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วบรรจุใส่ขวดสำหรับฉีด HPLC สำหรับนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี ใช้วัฏภาคคงที่ (stationary phase) เป็นคอลัมน์ชนิด VertiSep UPS C₁₈ HPLC Column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. × ความยาว 250 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรแอซิดิกในแอซิโตไนโตรล และ 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออ-

โรแอซิดิกในน้ำ ในอัตราส่วน 72:28 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ตัวอย่างของตำรับเจลงสารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมได้ตามวิธีข้างต้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตรสำหรับการวิเคราะห์ และใช้พื้นที่ใต้พีคคำนวณปริมาณสารไรนาแคนทิน ซี จากสมการเส้นตรงของกราฟสารมาตรฐานไรนาแคนทิน ซี ที่มีความเข้มข้น 10, 40, 70, 100, 130 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.5 การประเมินความปลอดภัยของตำรับเจลงสารสกัดรากทองพันชั่ง

2.5.1 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการตาม OECD Guidelines No. 471^[17]

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของเจลงสารสกัดรากทองพันชั่งในแบคทีเรียใช้วิธีการทดสอบอ้างอิงตาม OECD test guideline ที่ 471 หรือเรียกว่าวิธีทดสอบแอมส์ (Ames test) ใช้เชื้อแบคทีเรียในการทดสอบรวม 5 ชนิด ประกอบด้วย เชื้อ *Salmonella typhimurium* จำนวน 4 สายพันธุ์ (TA98, TA100, TA1535, และ TA1537) ได้จาก Japan Collection of Microorganisms (JCM) และเชื้อ *Escherichia coli* WP2 *uvrA* ได้จาก Leibniz Institute DMSZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด Oxid nutrient broth No.2 และ Luria broth ตามลำดับ และเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียในตู้แช่เยือกแข็ง -80 °C หรือเก็บที่ liquid nitrogen ก่อนนำมาใช้งาน การทดสอบมีขั้นตอน ดังนี้

- 1) การทดสอบคุณสมบัติเชื้อแบคทีเรีย ก่อนเริ่มการทดสอบ ตรวจยืนยันคุณสมบัติ

ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบในแต่ละด้าน ได้แก่

1.1) ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดินของเชื้อ *S. typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์: สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร Minimal glucose agar (MGA; Vogel-Bonner medium E, 40% glucose และ 1.5% agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่คลุมผิวเพลทด้วย Top agar (0.6% agar และ 0.5% NaCl) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ 0.1 M L-histidine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ/หรือ 1 mM D-biotin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรีย *S. typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ใช้ต้องเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนผสมของ L-histidine และ D-biotin

1.2) ความต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟนของเชื้อ *E. coli*: สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร MGA ที่มีส่วนผสมของ 0.05 mM tryptophan บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ *E. coli* ที่ใช้ต้องเจริญได้ดีบนอาหารนี้

1.3) การตรวจสอบ rfa mutation: ดูความไวของเชื้อต่อ crystal violet (sensitivity to crystal violet) เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ paper disc ที่มี 0.1% crystal violet วางบนเพลทที่มีเชื้อ *S. typhimurium* ในอาหาร MGA ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM L-histidine กับ 0.5 mM D-biotin กับเพลทที่มีเชื้อ *E. coli* ในอาหาร MGA ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM tryptophan นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยแบคทีเรียที่มี rfa mutation จะเกิดโซนใส (clear zone) คือไม่มีแบคทีเรียเจริญบริเวณรอบแผ่นทดสอบ โดยโซนใสนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-14 มิลลิเมตร

1.4) การตรวจสอบการมี R-factor plas-

mids: ดูการต้านทานยา ampicillin (ampicillin resistance) แบคทีเรียที่มี R-factor plasmids จะดื้อต่อยาเมื่อทำการทดสอบด้วย paper disc ที่มี 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ampicillin วางบนเพลทที่มีเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MGA ที่มีส่วนผสมของกรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้น แล้วนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการเจริญของเชื้อรอบแผ่นทดสอบสำหรับสายพันธุ์ที่มี R-factor (*S. typhimurium* TA98 และ TA100) จะไม่เกิดโซนใส (clear zone) คือมีแบคทีเรียเจริญบริเวณรอบแผ่นทดสอบ

1.5) การตรวจสอบ urvB mutation: ดูความไวของเชื้อต่อ mitomycin (sensitivity to mitomycin) เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ paper disc ที่มี 0.2 ไมโครกรัม mitomycin วางบนเพลทที่มีเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MGA ที่มีส่วนผสมของกรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้น แล้วนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการเจริญของเชื้อรอบแผ่นทดสอบ โดยแบคทีเรียที่มี urvB mutation จะเกิดโซนใส (clear zone) คือไม่มีแบคทีเรียเจริญบริเวณรอบแผ่นทดสอบ

2) การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ใช้วิธี plate incorporation ทำการทดสอบเจลาตอสกัดรากทองพันชั่งที่ 6 ระดับความเข้มข้น โดยหาขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงสุดของสารทดสอบที่ละลายอย่างสมบูรณ์และไม่เกิดตะกอน จากนั้นเตรียมสารทดสอบในความเข้มข้นที่เจือจางแบบ half log อีก 5 ความเข้มข้น ใช้แบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่เตรียมใหม่โดยการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 °C.

เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง (วัดความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีปริมาณเชื้อมากกว่า 1×10^9 cell/mL) ทำการทดสอบในระบบที่ไม่มีและไม่มีเอ็นไซม์กระตุ้น

2.1) การทดสอบในระบบที่ไม่มีเอ็นไซม์กระตุ้น: ผสมสารทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์ 0.5 M $\text{NaPO}_4\text{-KCl}$, pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ Top agar ปริมาตร 2 มิลลิตร (ใช้อาหารที่มีส่วนผสมของ L-histidine กับ D-biotin สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* และอาหารที่มีส่วนผสมของ tryptophan สำหรับเชื้อ *E. coli* อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45°C .) แล้วเทลงบนอาหาร MGA จากนั้นปล่อยให้อาหารแข็งตัว และนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 2^\circ\text{C}$. เป็นเวลา 50 ± 2 ชั่วโมง ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้น้ำปราศจากเชื้อแทนสารทดสอบสำหรับ negative (solvent or vehicle) control และใช้ positive control (Table 1) เมื่อครบกำหนดเพาะเลี้ยง อ่านผลการทดสอบ

2.2) การทดสอบในระบบที่มีเอ็นไซม์กระตุ้น: ใช้สารละลายผสมของ Aroclor 1254-induced male Sprague-Dawley rat liver และ Cofactor-I หรือเรียกว่า S9 mix เป็นตัวกระตุ้น ทำการทดสอบโดยวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบในระบบที่ไม่มีเอ็นไซม์กระตุ้น แต่ใช้ S9 mix ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แทนบัฟเฟอร์ 0.5 M $\text{NaPO}_4\text{-KCl}$, pH 7.4 และใช้ positive control (Table 1) เมื่อครบกำหนดเพาะเลี้ยง อ่านผลการทดสอบ

2.3) การอ่านผลและประเมินผลการทดสอบ: การทดสอบต้องไม่พบการตกตะกอนหรือเกิดการขุ่นบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า และทำการตรวจสอบความผิดปกติของ background lawn ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) นำเพลทมานับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (revertant colony) ด้วยเครื่องบันทึกภาพและนับโคโลนีแบบอัตโนมัติ สารทดสอบที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารทดสอบกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ re-

Table 1 Positive controls for bacterial reverse mutation assay

Chemicals	Strains	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)
Absence of metabolic activation system		
2-Nitrofluorene (2-NF)	TA98	2
Sodium azide (SA)	TA100 และ TA1535	0.5
Acridine mutagen ICR191 (ICR-191)	TA1537	0.5
4-Nitroquinoline-N-oxide (4NQNO)	WP2	0.5
Presence of metabolic activation system		
4-nitro-o-phenylenediamine (NPD)	TA99 และ TA100	20
4-Nitroquinoline-N-oxide (4NQNO)	TA1535	12.5
2-Nitrofluorene (2-NF)	TA1537	25
2-Aminoanthracene (2-AA)	WP2	20

vertant colony ที่เพิ่มขึ้น 1 ความเข้มข้นหรือมากกว่า 1 ความเข้มข้น แบบ dose-related response อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้นและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น และพบว่ามีค่าความเข้มข้นที่ทำให้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์มากกว่าจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (negative control) โดยต้องมีอย่างน้อย 1 ความเข้มข้น ที่สามารถทำให้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์สูงเกิน 2 เท่าของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

2.5.2 การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองด้วยวิธีการตาม OECD Guidelines No.404^[18]

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองของเอกสารสัปดาห์ทองพันธุ์ใช้วิธีตาม Test No. 404 ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [หมายเลขควบคุมโครงการ 63-031 (62-018)] ใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 3 ตัว ไม่ระบุเพศ ไม่จำกัดอายุ มีน้ำหนักไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม แยกเลี้ยงแต่ละตัวในกรงขนาดมาตรฐานเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดสอบ การดูแลสัตว์ทดลองเป็นไปตามมาตรการเลี้ยงสัตว์สากล และให้สัตว์กินอาหารและน้ำอย่างไม่จำกัดปริมาณ ก่อนเริ่มทดสอบ 24 ชั่วโมง โทนขนกระต่ายบริเวณหลังด้วยเครื่องโกนไฟฟ้า ใช้ตัวอย่างทดสอบเอกสารสัปดาห์ทองพันธุ์ 0.5 กรัม เป่าลงบนตำแหน่งที่ทดสอบ และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเป็นตัวอย่างควบคุม ทดสอบการกัดกร่อน (การทดสอบขั้นต้น) โดยการแปะตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุม 3 นาที แล้วอ่านผลการทดสอบ หาก

ไม่มีอาการทางผิวหนังให้ทดสอบขั้นต้นด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น โดยทำการแปะตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุม แล้วอ่านผลการทดสอบที่ 1 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ หากไม่มีอาการทางผิวหนัง (ไม่พบการกัดกร่อน) ให้ทดสอบการระคายเคือง (การทดสอบยืนยัน) โดยการแปะตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุม แล้วอ่านผลการทดสอบเมื่อครบ 4 ชั่วโมง โดยอ่านผลทดสอบอีก 4 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 1, 24, 48 และ 72 หลังเอาแผ่นแปะตัวอย่างออก ให้คะแนนระดับการเกิดรอยแดง (erythema) และบวม (oedema) บริเวณทดสอบ 0 ถึง 4 คะแนน สังเกตสุขภาพสัตว์และประเมินผลการกัดกร่อนโดยหากพบปฏิกิริยาการกัดกร่อนบริเวณที่แปะตัวอย่างทดสอบ เช่น เนื้อตาย (necrosis) แผลหลุม (ulcer) เลือดไหล (bleeding) สะเก็ดแผล (bloody scabs) จะให้สิ้นสุดการทดสอบทันที หากไม่พบการกัดกร่อน สัตว์จะถูกสังเกตอาการต่ออีก 14 วัน หลังเอาแผ่นแปะออก หากพบว่าผิวหนังเปลี่ยนไป หรือสีซีดลง มีภาวะขนร่วงและแผลเป็น วิธีการที่บ่งบอกว่าเป็นความเสียหายทางผิวหนังที่ไม่สามารถกลับคืนสู่ปกติ จะสรุปว่าตัวอย่างทดสอบมีคุณสมบัติการกัดกร่อน ประเมินผลการระคายเคืองโดยสังเกตการบวมหรือแดงตามระยะเวลาที่ทดสอบ กรณีพบอาการให้ติดตามสุขภาพสัตว์ต่ออีก 14 วัน เพื่อดูว่าอาการที่เกิดขึ้นสามารถกลับสู่ปกติได้หรือไม่ นอกจากนี้ สังเกตสุขภาพสัตว์นอกเหนือจากอาการทางผิวหนัง ได้แก่ น้ำหนักสัตว์ทดลอง การกินอาหารและน้ำ อัตราการตาย อาการแสดงออกหรือพฤติกรรมที่ผิดปกติ รวมถึงอาการไม่พึงประสงค์ที่ส่งผลกระทบต่อร่างกาย (systemic adverse effects) คำนวณผลการทดสอบโดยนำข้อมูลการสังเกตเฉพาะที่เวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง มาคำนวณคะแนนเฉลี่ยของการแดง

หรือบวม โดยค่าเฉลี่ยของการแดงหรือบวมในสัปดาห์ที่ 0 ถึง < 1.5 = ไม่ระคายเคือง, > 1.5 ถึง < 2.3 = ระคายเคืองอย่างอ่อน (category 3) ในสัปดาห์ที่ 2 ใน 3 ตัว และ > 2.3 ถึง < 4.0 = ระคายเคือง (category 2) ในสัปดาห์ที่ 2 ใน 3 ตัว^[18-19]

2.5.3 การประเมินความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งโดยการทดสอบการระคายเคืองในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี Single patch test

โครงการ “การประเมินความปลอดภัยของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งโดยการทดสอบการระคายเคืองในอาสาสมัครคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี Single patch test” ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสโครงการวิจัย 4/2563 วันที่ให้การรับรอง 6 เมษายน 2564 และดำเนินการตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ที่เป็นมาตรฐานสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline, International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP) และ 45 CFR460101 (b)

1) รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาโดยไม่มีกลุ่มควบคุมและเป็นแบบเปิดในผู้เข้าร่วมวิจัยสุขภาพดีจำนวน 10 คน เพื่อทดสอบการก่อการระคายเคืองของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง ด้วยวิธี single patch test

2) สารทดสอบ

สารที่ใช้ทดสอบคือ เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C), เจลพื้นที่มีองค์ประกอบเหมือนในตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งยกเว้นไม่มี

สารสกัดรากทองพันชั่ง (placebo) และ น้ำปราศจากเชื้อ (sterile water) (สารควบคุม)

3) กลุ่มประชากรที่จะศึกษา

กำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยเข้าร่วมโครงการ (inclusion criteria) คือ เพศชายและหญิงสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-60 ปี แบ่งเป็นเพศชายจำนวน 5 คน และเพศหญิงจำนวน 5 คน ไม่เคยมีประวัติการแพ้ หรือมีอาการแพ้ยา ยาสมุนไพร อาหาร หรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และหากเป็นเพศหญิง ต้องไม่อยู่ระหว่างให้นมบุตร หรือตั้งครรภ์ โดยจะมีการตรวจตั้งครรภ์ในวันที่เริ่มทำการศึกษา และกำหนดเกณฑ์การไม่รับผู้เข้าร่วมวิจัยเข้าร่วมโครงการ (exclusion criteria) คือ มีโรคประจำตัวหรือมีประวัติเป็นโรคหัวใจ โรคตับ โรคไต โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน เช่น โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคภูมิแพ้ตนเอง มีประวัติแพ้ยาสมุนไพร หรือมีผิวแพ้ง่าย ผู้ที่ได้รับยาแก้แพ้ ยาทาสเตียรอยด์ ยากดภูมิคุ้มกัน หรือยาที่มีผลรบกวนการทดสอบ เป็นเวลาน้อยกว่า 14 วันก่อนเริ่มการศึกษา และจนกระทั่งจบการศึกษา รวมถึงผู้ที่มิชนที่หลังดก มี กระ จุดต่างดำ ผื่น แผล เป็น รอยสัก รอยโรคที่ผิวหนังบริเวณแผ่นหลัง หรือมีพยาธิสภาพที่แสดงออกมาทางผิวหนัง เช่น สะเก็ดเงิน รื้อน กลาก ต่างขาว เกื้อื้อน และสิ่ว กำหนดเกณฑ์พิจารณายุติการศึกษาทั้งโครงการ (termination criteria for the study) เมื่อผู้เข้าร่วมวิจัยถูกถอนออกจากการศึกษามากกว่าร้อยละ 50

4) วิธีการทดสอบ

การทดสอบผิวหนังใช้วิธีการทดสอบตามมาตรฐานโดยปิดสารทดสอบบนผิวหนัง (closed patch test under occlusion) เพื่อดูการก่อการระคายเคือง ทำการทดสอบตามคำแนะนำใน COSMETICS EUROPE^[19] โดยจะตรวจแผ่นหลังของผู้

เข้าร่วมวิจัยด้วยตาเปล่าว่ามีผื่น ตุ่ม ในบริเวณใดหรือไม่ จากนั้นเช็ดทำความสะอาดบริเวณที่จะติดแผ่นทดสอบด้วย 70% แอลกอฮอล์ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำสารทดสอบ ได้แก่ เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง เจลพื้น และน้ำปราศจากเชื้อ ใส่ใน Finn Chamber® 8 mm (50 mm²) หลุมละ 25 ไมโครลิตร แล้วนำแผ่นทดสอบที่เตรียมได้ปิดลงบนแผ่นหลังบริเวณสะบักของผู้เข้าร่วมวิจัยโดยติดให้แนบสนิทกับผิวหนัง ให้ผู้เข้าร่วมวิจัยนั่งพัก 1 ชั่วโมงหลังติดแผ่นแปะ หากมีอาการข้างเคียงใดจึงปล่อยให้กลับบ้านได้ เมื่อปิดสารทดสอบครบ 48 ชั่วโมง ให้แกะแผ่นทดสอบออกจากนั้นเช็ดแผ่นหลังบริเวณที่ทดสอบของผู้เข้าร่วมวิจัยให้สะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์ แล้วให้ผู้เข้าร่วมวิจัยนั่งพักประมาณ 30 นาที เพื่อรออ่านผลการทดสอบครั้ง

ที่ 1 และกลับมาอ่านผลการทดสอบอีกครั้งเมื่อครบ 96 ชั่วโมง (ครั้งที่ 2) และสัปดาห์ที่ 3 (ครั้งที่ 3) รวมถึงมีการอธิบายให้ผู้เข้าร่วมวิจัยสังเกตอาการที่เกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มทดสอบจนถึงสิ้นสุดการทดสอบเพื่อสังเกตอาการผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นจากสารทดสอบ และมีการตรวจทางโลหิตวิทยา ตรวจสารชีวเคมีในเลือดเพื่อดูการทำงานของตับและไตก่อนเริ่มการศึกษาและหลังสิ้นสุดการศึกษา

5) การอ่านผลและวิเคราะห์ผลการทดสอบ^[20-22]

อ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่าภายใต้สภาวะที่มีแสงพอเพียง ตามระยะเวลาที่กำหนด โดยมีเกณฑ์คะแนนที่ใช้ในการประเมินผลการทดสอบการก่อการระคายเคือง (Table 2)

Table 2 Criteria for assessment of the irritation potential

Score	Category	Criteria			
		Erythema	Oedema	Dryness	Vesicles
0	Absent	No erythema	No oedema	No dryness of desquamation	No papule, vesicles, bulla, pustule
0.5	Very slight	Pink coloration of one part of the tested area	Very slight oedema	Slight dryness	Papule or small vesicle, < 1 mm
1	Slight	Pink coloration of the complete tested area	Slight oedema (visible)	Clear dryness	Vesicle, 1–2 mm
2	Obvious	Clear erythema (covered the tested area)	Clear oedema with/without papules or vesicles	Moderate desquamation	Pustules
3	Severe	Severe erythema (diffused outside the tested area)	Severe oedema (extended area outside the tested area)	Severe desquamation	Bulla

วิเคราะห์และประเมินผลการทดสอบการก่อการ
ระคายเคืองทำโดยนำผลการทดสอบมาคำนวณค่า

Cumulative Irritation Index (C.I.I.) ของผู้เข้าร่วม
วิจัยแต่ละรายโดยใช้สูตรคำนวณ (1)

$$C.I.I. = \frac{\sum \text{of scores (erythema + oedema + dryness + vesicles)}}{\text{Number of reading}} \quad (1)$$

ข้อมูล C.I.I. ของผู้เข้าร่วมวิจัยแต่ละรายจะถูก
นำมาใช้คำนวณค่า Mean Cumulative Irritation

Index (M.C.I.I.) ดังสมการ (2)

$$M.C.I.I. = C.I.I. / \text{number of subjects} \quad (2)$$

ค่า ที่ได้จะนำมาแปลผล ดังนี้ < 0.25 = non irritating/ negligible, 0.25 ถึง < 0.50 = very slightly irritating, 0.50 ถึง < 1.00 = slightly irritating, 1.00 ถึง < 2.00 = moderately irritating และ ≥ 2.00 = strongly irritating

ผลการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่งและ วิเคราะห์ปริมาณ rhinacanthin C ในสารสกัดด้วย วิธี HPLC

การจัดเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่งสำหรับใช้
ในการผลิตเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง สามารถเตรียม
สารสกัดได้ 27 กรัม และเมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ
สารสำคัญด้วยวิธี HPLC โดยวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง พบ
ว่า สารสกัดรากทองพันชั่งมีปริมาณ rhinacanthin C
ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างอยู่ที่ $56.395 \pm 0.763\%$ โดย
น้ำหนัก

2. การเตรียมตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง และวิเคราะห์คุณภาพ

นำสารสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมได้ข้างต้น

มาผลิตตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีความ
เข้มข้นของสารไรนาแคนทิน ซี 0.1% ขนาดการผลิต
13 กิโลกรัม (รุ่นการผลิต GELRN6301) เพื่อนำ
ไปใช้ในการทดสอบความปลอดภัย โดยดำเนินการ
ผลิตผลิตภัณฑ์ ณ โรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์
สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร และนำตำรับที่ผลิต
ขึ้น ไปวิเคราะห์คุณภาพ โดยการหาปริมาณสารไรนา
แคนทิน ซี ในตำรับยาเตรียม ตรวจสอบการปนเปื้อน
เชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีวิเคราะห์ตาม BP 2018^[23] และ
วิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วยเทคนิค atomic
absorption spectroscopy (ASS) เพื่อตรวจสอบ
การปนเปื้อนจากโลหะหนักในตำรับ มีผลการวิเคราะห์
คุณภาพ ดังแสดงในข้อมูล Certificate of Analysis
(COA) (Table 3)

Table 3 Quality assessment of *R. nasutus* root extract gel preparation (Lot No. GELRN01)**Certificate of Analysis (COA)****Product Name :** *Rhinacanthus nasutus* Root Extract Gel (0.1% rhinacanthin C)**Active Ingredients :** rhinacanthin C**Manufacturing Date :** 02/01/2020**Manufacturer :** Medicinal Plant Research Institute **Analytical Date :** 20/01/2020**Lot No. :** GELRN6301**Batch Size :** 13 kg

Test Parameter	Requirement	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 (0.1 % w/w)	108.13% of labeled amount (0.108 % w/w)
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</i> spp	Absence/g	Absence/g
Heavy metals**		
- Arsenic	≤ 4 ppm	Absence/g
- Cadmium	≤ 0.3 ppm	Absence/g
- Lead	≤ 10 ppm	Absence/g
- Mercury	≤ 0.5 ppm	Absence/g
pH	5.4-5.9	5.5

*British Pharmacopoeia 2018

**Thai Herbal Pharmacopoeia 2019

Conclusion: PASS

3. การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการตาม OECD Guidelines No. 471

การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้

ในการทดสอบพบว่าเชื้อ *S. typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ (TA98, TA100, TA1535 และ TA1537) และเชื้อ *E. coli* WP2 uvrA มีคุณสมบัติตรงตามลักษณะทางพันธุกรรมที่กำหนดทุกการทดสอบ (Table 4)

Table 4 Test system characterization

Characteristics	Tester strains				
	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 uvr A
Genetic characteristics of bacteria					
<i>his</i> / <i>trp</i> mutation	<i>hisD3052</i>	<i>hisG46</i>	<i>hisG46</i>	<i>hisC3076</i>	<i>trpE</i>
Additional mutation	<i>rfa uvrB</i>	<i>rfa uvrB</i>	<i>rfa uvrB</i>	<i>rfa uvrB</i>	<i>uvrA</i>
Plasmid	R factor (pKM101)	R factor (pKM101)	-	-	-
Types of mutation	Frame-shift mutation	Base-pair substitution	Base-pair substitution	Frame-shift mutation	Base-pair substitution
Verification of genetic characteristics of bacteria					
Amino acid requirement					
Negative	-	-	-	-	-
Histidine	++	++	++	++	N/A
Biotin	-	-	-	-	N/A
Histidine + Biotin	+++	+++	+++	+++	N/A
Tryptophane	N/A	N/A	N/A	N/A	+++
<i>rfa</i> mutation	clear zone	clear zone	clear zone	clear zone	clear zone
R-factor	no clear zone	no clear zone	clear zone	clear zone	clear zone
<i>uvrB</i> mutation	clear zone	clear zone	clear zone	clear zone	clear zone

N/A means Not applicable

ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) อยู่ในช่วง 15-5,000 ไมโครกรัมต่อเพลท โดยในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่พบการตกตะกอนของสารทดสอบเมื่อนำมาผสมกับ Top agar และไม่พบความเป็นพิษของของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบทุกสายพันธุ์ในระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบทั้ง 6 ระดับความเข้มข้น (5, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อเพลท) ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อ

แบคทีเรียในระบบที่ไม่มีและมิเอนไซม์กระตุ้น พบว่าเจลสารสกัดรากทองพันชั่งไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบทุกสายพันธุ์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ โดยไม่พบจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นมากกว่าจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (negative control) สูงขึ้นเกิน 2 เท่า และไม่พบความผิดปกติของ background lawn ในเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบทุกสายพันธุ์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ (Table 5)

Table 5 Mutation test results of *R. nasutus* root extract gel preparation

Tester strains	Test samples	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Average of revertant colony/plate [background lawn]			
			Without S9 mix		With S9 mix	
Test item : <i>R. nasutus</i> root extract gel (0.1% rhinacanthin C)						
TA98	<i>R. nasutus</i> root extract gel	0	15.00 $\pm$ 2.65	[N]	36.00 $\pm$ 6.56	[N]
		5,000	16.67 $\pm$ 3.06	[N]	40.67 $\pm$ 12.66	[N]
		1,500	18.67 $\pm$ 3.79	[N]	31.00 $\pm$ 3.46	[N]
		500	23.67 $\pm$ 4.04	[N]	28.67 $\pm$ 4.73	[N]
		150	17.67 $\pm$ 4.04	[N]	36.33 $\pm$ 7.09	[N]
		50	20.67 $\pm$ 2.89	[N]	36.33 $\pm$ 0.58	[N]
		15	21.33 $\pm$ 2.89	[N]	35.00 $\pm$ 1.00	[N]
TA100	<i>R. nasutus</i> root extract gel	0	148.33 $\pm$ 17.79	[N]	155.33 $\pm$ 1.15	[N]
		5,000	133.33 $\pm$ 4.73	[N]	155.33 $\pm$ 14.05	[N]
		1,500	142.00 $\pm$ 12.53	[N]	149.00 $\pm$ 6.24	[N]
		500	138.67 $\pm$ 13.43	[N]	156.33 $\pm$ 10.02	[N]
		150	147.67 $\pm$ 11.02	[N]	158.00 $\pm$ 4.36	[N]
		50	122.33 $\pm$ 8.39	[N]	165.33 $\pm$ 17.24	[N]
		15	129.67 $\pm$ 8.74	[N]	153.00 $\pm$ 5.00	[N]
TA1535	<i>R. nasutus</i> root extract gel	0	12.67 $\pm$ 3.51	[N]	10.33 $\pm$ 5.03	[N]
		5,000	9.67 $\pm$ 6.03	[N]	11.00 $\pm$ 2.00	[N]
		1,500	14.00 $\pm$ 1.00	[N]	8.33 $\pm$ 3.06	[N]
		500	14.67 $\pm$ 2.52	[N]	11.00 $\pm$ 2.00	[N]
		150	17.00 $\pm$ 5.00	[N]	11.00 $\pm$ 1.00	[N]
		50	10.00 $\pm$ 1.73	[N]	13.67 $\pm$ 4.04	[N]
		15	11.33 $\pm$ 5.77	[N]	12.67 $\pm$ 7.64	[N]
TA1537	<i>R. nasutus</i> root extract gel	0	4.00 $\pm$ 1.00	[N]	13.33 $\pm$ 4.73	[N]
		5,000	6.67 $\pm$ 2.08	[N]	13.67 $\pm$ 3.79	[N]
		1,500	5.00 $\pm$ 1.00	[N]	13.00 $\pm$ 1.00	[N]
		500	3.67 $\pm$ 2.08	[N]	15.33 $\pm$ 6.11	[N]
		150	7.00 $\pm$ 2.65	[N]	9.00 $\pm$ 2.65	[N]
		50	4.33 $\pm$ 1.53	[N]	15.00 $\pm$ 5.57	[N]
		15	3.00 $\pm$ 1.00	[N]	13.67 $\pm$ 2.52	[N]
WP2 <i>uvrA</i>	<i>R. nasutus</i> root extract gel	0	60.00 $\pm$ 11.14	[N]	49.33 $\pm$ 9.02	[N]
		5,000	62.67 $\pm$ 1.53	[N]	59.00 $\pm$ 9.54	[N]
		1,500	59.00 $\pm$ 13.00	[N]	54.00 $\pm$ 9.54	[N]
		500	60.00 $\pm$ 4.58	[N]	71.33 $\pm$ 5.51	[N]
		150	64.00 $\pm$ 5.20	[N]	59.33 $\pm$ 8.05	[N]
		50	65.00 $\pm$ 4.36	[N]	48.00 $\pm$ 3.61	[N]
		15	59.67 $\pm$ 10.60	[N]	50.67 $\pm$ 5.69	[N]
Positive controls :						
TA98	2-NF	2.0	492.67 $\pm$ 30.92	[N]	-	
TA100	SA	0.5	494.67 $\pm$ 18.82	[N]	-	
TA1535	SA	0.5	379.00 $\pm$ 7.81	[N]	-	
TA1537	ICR-191	0.5	581.67 $\pm$ 50.21	[N]	-	
WP2 <i>uvrA</i>	4NQNO	0.5	373.33 $\pm$ 10.41	[N]	-	
TA98	NPD	20.0	-		132.67 $\pm$ 122.71	[N]
TA100	NPD	20.0	-		390.00 $\pm$ 6.56	[N]
TA1535	4NQNO	12.5	-		79.00 $\pm$ 11.00	[N]
TA1537	2NF	25.0	-		561.33 $\pm$ 5.51	[N]
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	20.0	-		742.77 $\pm$ 77.70	[N]

N means Normal of Background lawn (evaluated using inverted microscope)

4. การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/ การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองด้วยวิธีทดสอบตาม OECD Guidelines No.404

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/
การกัดกร่อนในสัตว์ทดลอง ของเอกสารสักราก
ทองพันชั่ง ใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White
เพศผู้ 3 ตัว น้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดสอบ 2.97-3.28
กิโลกรัม ใช้เวลาในการทดสอบรวม 36 วัน การสังเกต
สุขภาพสัตว์ระหว่างการทดสอบ พบว่ากระต่ายทุกตัว
มีสุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์ น้ำหนักตัวขึ้นตามปกติ
ยกเว้นกระต่าย 2 ตัว ที่มีน้ำหนักตัวลดลงเล็กน้อยใน
บางช่วงของการทดสอบ โดยตัวที่ 1 น้ำหนักลดลงใน
ช่วงการทดสอบชั่วโมงแรกถึงการอ่านผลที่ 24 ชั่วโมง
และตัวที่ 2 น้ำหนักลดลงในช่วงการทดสอบชั่วโมงที่
72 ถึงสิ้นสุดการใช้สัตว์ ซึ่งอาจเกิดจากภาวะเครียด
ระหว่างการทำการศึกษา แต่ในช่วงอื่น ๆ กระต่ายทุก
ตัวมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นทุกระยะของการทดสอบ สามารถ
กินอาหารและน้ำได้ดีเป็นปกติ ไม่พบการป่วย-ตาย
หรือพฤติกรรมที่ผิดปกติ และไม่พบวิธีการทางผิวหนัง
และการกัดกร่อน เอกสารสักรากทองพันชั่งมีค่า
เฉลี่ยของการแดงในสัตว์แต่ละตัวอยู่ที่ 0.33-0.67
และมีค่าเฉลี่ยของการบวมในสัตว์แต่ละตัว อยู่ที่ 0
ซึ่งอยู่ในช่วง 0 ถึง < 1.5 สามารถแปลผลได้ว่า เกล
สารสักรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ไม่
ก่อการระคายเคือง/การกัดกร่อนต่อผิวหนังกระต่าย

5. การประเมินความปลอดภัยของเอกสารสักราก ทองพันชั่งโดยการทดสอบการระคายเคืองในผู้ เข้าร่วมวิจัยคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี Single patch test

การทดสอบการระคายเคืองในผู้เข้าร่วมวิจัย
สุขภาพดี จำนวน 10 คน เป็นเพศชาย 5 คน เพศหญิง 5
คน อายุระหว่าง 26-53 ปี โดยมีอายุเฉลี่ย 37.2 ปี การ

ประเมินผลการทดสอบเบื้องต้นจากการซักถามอาการ
เพิ่มเติมของผู้เข้าร่วมวิจัย และการอ่านผลการทดสอบ
ในบริเวณที่ติดแผ่นแปะ ไม่พบผู้เข้าร่วมวิจัยที่เกิด
รอยแดง (erythema), บวม (oedema), ผิวแห้งเป็น
สะเก็ด (dryness/ scaling) หรือเกิดตุ่มน้ำ (vesicles)
ในบริเวณทดสอบที่แปะเอกสารสักรากทองพันชั่ง
(0.1% rhinacanthin C), เจลพื้น และน้ำปราศจากเชื้อ
ทั้งในการอ่านผลครั้งที่ 1 (หลังการแปะแผ่นทดสอบ
48 ชั่วโมง), การอ่านผลครั้งที่ 2 (หลังการแปะแผ่น
ทดสอบและแกะแผ่นทดสอบออก 96 ชั่วโมง) และการ
อ่านผลครั้งที่ 3 (หลังการทดสอบ 3 สัปดาห์) อย่างไร
ก็ตาม พบผู้เข้าร่วมวิจัยเพศหญิง 1 ราย อายุ 29 ปี มี
ผื่นคันในร่มผ้าในตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณทดสอบ (หลัง
ท้อง และเอว) ในการอ่านผลการทดสอบครั้งที่ 2 และ
ผู้เข้าร่วมวิจัยรายดังกล่าวได้ไปพบแพทย์ในวันที่ 12
หลังเริ่มการทดสอบ ตรวจวินิจฉัยว่าเป็นผื่นกุหลาบ
ได้รับยาทาสเตียรอยด์ Clobetasol โดยผู้เข้าร่วมวิจัย
แจ้งเพิ่มเติมในการอ่านผลการทดสอบครั้งที่ 3 ว่าใน
ช่วงระยะเวลา 1 เดือนก่อนเข้าร่วมการศึกษาเคยได้
รับวัคซีนโควิด-19 เนื่องจากผู้เข้าร่วมวิจัยรายดังกล่าว
ได้รับยาทาสเตียรอยด์ในระหว่างการการศึกษา ซึ่งตรงกับ
เกณฑ์การแยกอาสาสมัครออกจากโครงการ จึงไม่อ่าน
ผลการทดสอบครั้งที่ 3

การวิเคราะห์ผลการทดสอบการระคายเคืองโดย
การคำนวณค่า Cumulative Irritation Index (C.I.I.)
ของผู้เข้าร่วมวิจัยแต่ละราย พบว่า ค่า C.I.I. ของผู้เข้า
ร่วมวิจัยทุกรายมีค่าเป็น 0 เมื่อนำข้อมูล C.I.I. ของผู้เข้า
ร่วมวิจัยแต่ละรายมาคำนวณค่า Mean Cumulative
Irritation Index (M.C.I.I.) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0 ซึ่ง
แปลผลได้ว่าตำรับเอกสารสักรากทองพันชั่ง (0.1%
rhinacanthin C) ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง
นอกจากนี้ ไม่พบความแตกต่างของผลการตรวจทาง

โลหิตวิทยาและการตรวจสารชีวเคมีในเลือดก่อนเริ่มการศึกษาและหลังสิ้นสุดการศึกษา

อภิปรายผล

การจัดเตรียมสารสกัดรากทองพันชั่งให้มีคุณภาพในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการนำไปผลิตตำรับเจลาตินสกัดรากทองพันชั่งในโรงงานต้นแบบครั้งนี้พบว่าลักษณะของสารสกัดที่เตรียมได้ไม่แตกต่างจากลักษณะของสารสกัดที่เตรียมขึ้นในปริมาณน้อยเพื่อนำไปใช้ผลิตตำรับในระดับห้องปฏิบัติการ สารสกัดรากทองพันชั่งที่ได้มีปริมาณสารสำคัญโรนาแคนทินซี อยู่ที่ $56.395 \pm 0.763\%$ โดยน้ำหนัก ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใกล้เคียงกับสารสกัดที่เตรียมขึ้นในปริมาณน้อยเพื่อนำไปใช้ผลิตตำรับในระดับห้องปฏิบัติการ^[16] การเตรียมเจลาตินสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ในโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร ได้เปลี่ยนมาใช้สารประกอบในตำรับส่วนใหญ่เป็นสารเคมีชนิด pharmaceutical grade พบว่าลักษณะทางกายภาพของตำรับที่เตรียมได้ไม่แตกต่างจากตำรับที่เตรียมในระดับห้องปฏิบัติการ และมีปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญโรนาแคนทินซี อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ร้อยละ 90.0-110.0 ของปริมาณที่ระบุในฉลาก) ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนจุลชีพ (microbial limit test) และการวิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนัก (heavy metal test) เช่น สารหนู (arsenic) แคดเมียม (cadmium) ปรอท (mercury) และ ตะกั่ว (lead) พบว่าอยู่ในปริมาณที่กำหนดตามเกณฑ์การยอมรับของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2019^[24] ดังนั้นเจลาตินสกัดรากทองพันชั่งที่เตรียมได้นี้จึงมีคุณภาพตรงตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด และตำรับมีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปศึกษาความปลอดภัย

ตำรับเจลาตินสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) จัดเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรประเภทยาจากสมุนไพรที่วิจัยพัฒนา (ข3) หมายถึง ยาจากสมุนไพร ยาตามองค์ความรู้แพทย์ทางเลือกอื่นที่ต้องอาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยทางคลินิก ข้อมูลจากวารสารทางวิชาการ การศึกษาพรีคลินิก ร่วมกับข้อมูลตามองค์ความรู้ที่สืบทอดต่อกันมา ซึ่งยากลุ่มนี้ควรต้องมีเอกสารข้อมูลที่ไม่ใช่การศึกษาทางคลินิก (non-clinical study reports) ทั้งในส่วน *in vitro* และ *in vivo* ที่แสดงข้อมูลด้านความปลอดภัย ซึ่งในส่วน *in vitro* กำหนดให้มีการศึกษา genotoxicity ของผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วย โดยข้อมูลด้านความปลอดภัย รวมถึงข้อมูลด้านพิษวิทยาที่ได้ ควรปฏิบัติตามระเบียบวิธีการวิจัยที่ดีตามมาตรฐานสากล เช่น Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)^[25] ในการศึกษาขั้นนี้ได้ประเมินความเป็นพิษทางพันธุกรรมของตำรับเจลาตินสกัดรากทองพันชั่ง โดยใช้วิธีการทดสอบที่ได้รับการรับรองจากองค์กรระหว่างประเทศ ทำการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการตาม OECD Guideline No. 471 เลือกใช้เชื้อ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2 *uvrA* ซึ่งเป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่มีการกลายพันธุ์ทั้งแบบ frameshift mutation และ base-pair substitution mutation^[17] ทำการทดสอบเจลาตินสกัดรากทองพันชั่งที่ 6 ระดับความเข้มข้น (5, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อเพลท) ทั้งในระบบที่ไม่มีและมีเอนไซม์กระตุ้น ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าตำรับเจลาตินสกัดรากทองพันชั่งไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบทั้งในระบบที่ไม่มีและมีเอนไซม์กระตุ้น แม้ว่ารากทองพันชั่ง

เคยมีประวัติการใช้อ้างอิงตามตำราทางการแพทย์แผนโบราณในประเทศไทยที่ระบุถึงสรรพคุณในการแก้กลากเกลื้อน ผื่นคัน และโรคผิวหนังที่เป็นน้ำเหลืองบางชนิด^[2] รวมถึงมีรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารสกัดรากทองพันชั่งต่อเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง^[5] ซึ่งนับเป็นการยืนยันถึงสรรพคุณของสมุนไพรนี้อย่างชัดเจนอย่างไรก็ตาม เมื่อค้นหาข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาความเป็นพิษทางพันธุกรรมของสมุนไพรนี้ จนถึงปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาในด้านนี้มาก่อน ทำให้ไม่มีข้อมูลด้านความเป็นพิษทางพันธุกรรมของรากทองพันชั่งที่จะนำมาใช้อ้างอิงได้ ดังนั้นผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งครั้งนี้จึงเป็นการยืนยันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สมุนไพรดังกล่าวในด้านไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษทางพันธุกรรม

การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ดำเนินการทดสอบตามวิธีการที่อ้างอิงตาม OECD Guidelines No.404 โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White การทดสอบแสดงให้เห็นว่าตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งไม่มีฤทธิ์ในการกัดกร่อน และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองทางผิวหนัง ซึ่งผลการทดสอบของผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ผลิตในโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรครั้งนี้ สอดคล้องกับผลการทดสอบการระคายเคืองของเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งดำเนินการทดสอบตามข้อกำหนด ISO 10993-10: 2010 โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ albino^[16] ผลการทดสอบที่ได้นี้จึงเป็นข้อมูลที่ไม่ใช่การศึกษาทางคลินิกในส่วน *in vivo* ที่แสดงข้อมูลด้านความปลอดภัยของตำรับ

เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง

ผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) นับเป็นยาจากสมุนไพรที่วิจัยพัฒนา (ข3) ที่ซึ่งประวัติการใช้แบบดั้งเดิมที่อ้างอิงไม่สามารถประเมินขนาดการใช้ของผลิตภัณฑ์ได้ อาจมีความจำเป็นต้องยื่นข้อมูลด้านความปลอดภัยและประสิทธิผลอื่น ๆ เพิ่มเติมในการขออนุญาตผลิตภัณฑ์สมุนไพร^[25] ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ประเมินความปลอดภัยของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งในระดับคลินิก โดยการทดสอบการระคายเคืองในผู้เข้าร่วมวิจัยคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี Single patch test ทำการทดสอบตามคำแนะนำใน COSMETICS EUROPE ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองในผู้เข้าร่วมวิจัยคนไทยสุขภาพดี โดยไม่พบผู้เข้าร่วมวิจัยที่เกิดรอยแดง (erythema), บวม (oedema), ผิวแห้งเป็นสะเก็ด (dryness/ scaling) หรือเกิดตุ่มน้ำ (vesicles) ในบริเวณทดสอบที่แปะเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง จากผลการประเมินด้านความปลอดภัยของตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่ง (0.1% rhinacanthin C) ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* รวมถึงการทดสอบในระดับคลินิกสามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีความปลอดภัยสำหรับนำไปใช้ในมนุษย์ สูตรตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรนี้ สามารถนำไปศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของตำรับในระดับคลินิกเพื่อประเมินผลในการรักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังจากเชื้อราได้ต่อไป

ข้อสรุป

การศึกษานี้ ได้ทดลองผลิตตำรับเจลสารสกัดรากทองพันชั่งที่มีปริมาณสารโรรินาแคนทิน ซี 0.1%

w/w ในโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร และตรวจวิเคราะห์คุณภาพของตำรับผลิตภัณฑ์ให้ตรงตามเกณฑ์มาตรฐาน โดยเจลาตินสกัดจากทองพันชั่งที่เตรียมได้มีปริมาณสารสำคัญโรรินาเคนทิน คิดเป็น 0.108% w/w ซึ่งเป็นไปตามกำหนด (90.0-110.0% ของปริมาณที่ระบุในฉลาก) ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และการปนเปื้อนโลหะหนักพบว่าอยู่ในปริมาณที่กำหนดตามเกณฑ์การยอมรับของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2019 เมื่อนำตำรับไปศึกษาความปลอดภัยโดยการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีตาม OECD Guideline for Testing of Chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test, Test No. 471 ใช้วิธี plate incorporation ทำการทดสอบด้วยระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้นและมีเอนไซม์กระตุ้นพบว่าตำรับเจลาตินสกัดจากทองพันชั่งไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียที่ใช้การศึกษาทุกสายพันธุ์ การทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองด้วยวิธีตาม OECD Guideline for Testing of Chemicals : Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test No. 404 พบว่าตำรับเจลาตินสกัดจากทองพันชั่งไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและไม่พบการกัดกร่อน นอกจากนี้ ผลการศึกษาความปลอดภัยของเจลาตินสกัดจากทองพันชั่งโดยการทดสอบการระคายเคืองในผู้เข้าร่วมวิจัยคนไทยสุขภาพดีด้วยวิธี Single patch test พบว่าตำรับเจลาตินสกัดจากทองพันชั่งไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนังของผู้เข้าร่วมวิจัย ดังนั้น เจลาตินสกัดจากทองพันชั่งตามสูตรตำรับนี้จึงมีความปลอดภัยสำหรับนำไปใช้ในมนุษย์ สามารถนำไปศึกษาในระดับคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิผลและความปลอดภัยของตำรับในการรักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังจากเชื้อราได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการให้ทุนสนับสนุนการศึกษานี้

References

1. Thiangburanathum W. Dictionary of Thai medicinal plants. 5th ed. Bangkok: Aksornpittaya; 1999. (in Thai)
2. 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; 1869. (in Thai)
3. 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.
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, Autthateinchai 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)
6. 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.
7. Sendl 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Anti-allergic principles of *Rhinacanthus nasutus* leaves. *Phytomedicine*. 2009;16:929-34.
12. 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.
13. Deepa N, Ravichandran V. Anti-fungal activity of various extracts of *Rhinacanthus nasutus* (L). Kurtz. *Nat Prod Indian J*. 2008;4(2):125-7.
14. Wisuitiprot W. Antifungal activity of *Rhinacanthus nasutus* extract against *Malassezia* sp. *J Health Sci*. 2012;21(3):521-8. (in Thai)
15. 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)
16. Pruksakorn P, Jaima C, Sumateewatanakul V, Sanguanruang 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)
17. OECD guideline for testing of chemicals. Bacterial reverse mutation test. [Internet]. 2020 [cited 2022 Dec 9]; [12 pages]. Available from: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071247-en.pdf?expires=167038034&id=id&accname=guest&checksum=46C91D89F66D5860DAAE9CE558ADB2EE>
18. OECD guideline for testing of chemicals. Acute dermal irritation/ corrosion. [Internet]. 2015 [cited 2022 Dec 6]; [8 pages]. Available from: www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264242678-en.pdf?expires=1670390038&id=id&accname=guest&checksum=02AF5206A58CB39F482A45498B3D0D0D
19. 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 2022 Dec 6]; [247 pages]. Available from: [https://www.oecd.org/official documents/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2001\)6&doclanguage=en](https://www.oecd.org/official documents/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2001)6&doclanguage=en)
20. Cosmetics Europe. Product test guideline for the assessment of human skin compatibility. [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 7]; [26 pages]. Available from: https://www.cosmeticseurope.eu/files/6014/6407/8875/Product_Test_Guidelines_for_the_Assessment_of_Human_Skin_Compatibility_-_1997.pdf
21. Mulyanti YS, Yuliarni, Kasemchainan B, Mitra PP, Evans P, Hartono H. Evaluation of the skin irritation and sensitization potential of the Cussons baby sensicare skin range of products in healthy volunteers. *J Cosmet Dermatol Sci Appl*. 2019;9:207-15.
22. Roussel CQ, Poncet M, Mesaros S, Clucas A, Baker M, Soloff AM. Comparison of the cumulative Irritation potential of adapalene gel and cream with that of erythromycin/tretinoin solution and gel and erythromycin/isotretinoin gel. *Clin Ther*. 2001;23(2):205-12.
23. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2018. London: TSO; 2017.
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; 2019.
25. Herbal product division, Thai Food and Drug Administration. Guideline for preparing documents for herbal product license in low-risk cases. [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 7]; [75 pages]. Available from: https://www.fda.moph.go.th/Herbal/SitePages/Document/product/3.product_allow.pdf