

## การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอกจากสารสกัดใบรางจืดเพื่อบรรเทาอาการอักเสบ

### Topical Formulation Containing Rangchuet Leaf Extract for Anti-inflammatory Use

รัตนา อินทรานุปกรณ์\*, ฤดี เสาวคนธ์, ทฤดมมน ธรรมวัฒน์, ณัฐกุล เซาวกุล, ธนวัฒน์ ทิมกระจ่าง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเฉลิมพระเกียรติ

\*Email : nong2indra@gmail.com

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอกจากสารสกัดใบรางจืด ซึ่งจะเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์อีกทางเลือกหนึ่งในการลดการอักเสบ โดยเตรียมสารสกัดใบรางจืดด้วยการหมักด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ปริมาณสารสำคัญ apigenin ในสารสกัดใบรางจืดที่เตรียมได้จะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) องค์กรประกอบในสารสกัดถูกแยกบนแผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วย silica gel 60 GF<sub>254</sub> ในระบบตัวทำละลาย toluene : ethyl acetate : formic acid 6:4:0.2 v/v/v และตรวจวัดด้วย densitometer ที่ 325 nm ผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดใบรางจืดมีปริมาณ apigenin 206.5 mg/g จากนั้นนำสารสกัดไปพัฒนาต่อเป็นตำรับยาใช้ภายนอกใน 2 รูปแบบ คือ ไฮโดรเจลและออร์แกนเจล โดยมีความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืด 0.5 %w/w ตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืดประกอบด้วยสารสกัดใบรางจืด, Carbomer 943 (สารก่อเจล 1.2 %), menthol, isopropyl alcohol, sodium hydroxide, thymol และน้ำ ส่วนตำรับออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืดประกอบด้วยสารสกัดใบรางจืด, Pluronic F-127 (สารก่อเจล 1.2 %), lecithin, isopropyl palmitate, Germaben™ II และน้ำ ทำการทดสอบความคงตัวของตำรับโดยประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และประสาทสัมผัส ผลการศึกษาพบว่า ตำรับเจลใช้ภายนอกทั้ง 2 รูปแบบมีความคงตัวทางกายภาพในช่วงระยะเวลาที่ทำการทดลอง 90 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง, 5°C และ 45°C และไม่พบการระคายเคืองทางผิวหนังในอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 35 คน จากผลการทดลองพบว่ารูปแบบเลซิทินออร์แกนเจลสามารถบรรจุ apigenin ได้ในความเข้มข้นที่สูงกว่ารูปแบบไฮโดรเจล ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเลซิทินออร์แกนเจลงาน่าจะเป็นรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการใช้ apigenin ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอก ซึ่งต้องศึกษาต่อไป

**คำสำคัญ :** รางจืด สารสกัดใบรางจืด ไฮโดรเจล ออร์แกนเจล HPTLC

#### Abstract

The aim of this study was to formulate the topical anti-inflammatory containing Rangchuet leaf extract which can be an alternative dosage form for its anti-inflammatory use. Rangchuet leaf was extracted with ethanol by maceration at ambient temperature for one week. The amount of active compound, apigenin, was determined by HPTLC method. The chromatographic separation was achieved on HPTLC aluminium sheets of silica gel 60 GF<sub>254</sub> using toluene:ethyl acetate:formic

acid (6:4:0.2 v/v/v) as developing solvent system and densitometric scanning 325 nm. The results indicated that the obtained Rangchuet leaf extract contained apigenin 206.52 mg/g. Then, the extract was developed into two different dosage forms, hydrogel and organogel at the concentration 0.5 %w/w. The Rangchuet hydrogel was prepared from a mixture of Rangchuet leaf extract, Carbomer 934 (gelling agent, 1.2%), menthol, isopropyl alcohol, sodium hydroxide, thymol and water, whereas, the Rangchuet organogel was prepared from a mixture of Rangchuet leaf extract, Pluronic F-127 (gelling agent, 1.2 %), lecithin, isopropyl palmitate, Germaben™ II and water. Stability studies of the formulations were evaluated in terms of physicochemical properties and organoleptic feature. The results showed that both topical gel formulations were found to be physically stable over periods of 90 days at room temperature, 4°C and 45°C. In addition, these formulations made none of the 35 healthy volunteers irritated after closed patch testing. It was also found that apigenin could be incorporated at higher concentration into lecithin organogel than hydrogel. Our study demonstrates that lecithin organogels are promising vehicles for topical application of apigenin, which should study further.

**Keywords :** Rangchuet, Rangchuet leaf extract, hydrogel, organogel, HPTLC

## บทนำ

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*, Acanthaceae) เป็นพืชเขตร้อน พบได้ทั่วไปทุกภาคในประเทศไทยและในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้เถา มักเกาะเกี่ยวกับต้นไม้ใหญ่ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปหัวใจ ปลายใบแหลม สีเขียว ผิวเรียบเกลี้ยง ช่อดอกออกที่ยอดหรือซอกใบ ดอกเป็นรูปแตรสั้น กลีบดอกสีม่วงอ่อนอมฟ้า ผลเป็นผลแห้งแตก<sup>1</sup> ในประเทศไทยมีการใช้พืชนี้ในทางการแพทย์แผนไทยและเป็นสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ใช้เพื่อถอนพิษเบื่อเมา แก้ไข้ และลดความร้อนในร่างกาย ในรูปแบบยาขงและแคปซูล<sup>1-3</sup> ภูมิปัญญาท้องถิ่นได้มีการใช้รางจืดเป็นยาภายนอก ใช้พอกบาดแผล ช่วยรักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ลดอาการอักเสบจากการแพ้ผื่นคัน แผลงัดต่อย และโรคผิวหนัง เช่น เริม<sup>1</sup>

จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่าใบรางจืดมีองค์ประกอบทางเคมีหลายกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ<sup>1,4</sup> ได้แก่ สารกลุ่ม phenolics เช่น apigenin, caffeic acid, caffeoylmalic acid, gallic acid, chlorogenic acid; สารกลุ่ม sterols เช่น  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\alpha$ -spinasterol; สารกลุ่ม carotenenes เช่น lutein จึงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายด้าน จากรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดใบรางจืดนอกจากใช้เป็นยาถอนพิษจากสารกำจัดศัตรูพืช (กลุ่ม organophosphates, carbamates) และลดพิษของยาฆ่าหญ้า paraquat แล้ว ยังมีฤทธิ์ต้านพิษของแอลกอฮอล์ต่อตับ<sup>5</sup> ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ทั้งเชื้อ gram positive และ gram negative หลายชนิด<sup>3</sup> ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity)

ผลการศึกษาทางพรีคลินิกและคลินิกพบว่า apigenin ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมากในใบรางจืด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้ง cyclooxygenase-2 ได้ดีกว่า celecoxib ในผู้ป่วยโรค

rheumatoid arthritis ด้วย<sup>6</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ apigenin รูปแบบใช้ภายนอก ใน acute dermatitis (murine model) พบว่าสามารถลด cutaneous inflammation ได้ โดยช่วยลดการสูญเสีย transdermal water, ลด skin surface pH และเพิ่ม stratum corneum hydration อย่างมีนัยสำคัญ<sup>7</sup>

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ของรางวัลที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน อยู่ในรูปแบบใช้ภายในเท่านั้น ซึ่งอาจบริหารยาได้ไม่สะดวกในผู้ป่วยบางกลุ่มและอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรงกว่า จากหลักฐานทางวิชาการที่บ่งบอกว่าสารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระได้ เพื่อเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาไทย และสร้างทางเลือกใหม่ให้แก่ผู้บริโภค คณะผู้วิจัยเห็นว่าหากตำรับจากสารสกัดใบรางจืดเป็นรูปแบบใช้ภายนอก จะใช้งานได้สะดวกมากกว่าผู้ป่วยให้ความร่วมมือในการใช้ยาและเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา จึงทำการพัฒนาตำรับใช้ภายนอกในรูปแบบเจล เนื่องจากเจลจะปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็ว โดยไม่ขึ้นกับคุณสมบัติการละลายน้ำของยา นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการเปรียบเทียบในรูปแบบไฮโดรเจลและออร์แกนเจล ซึ่งมีของเหลวในระบบเป็นน้ำและสารอินทรีย์ตามลำดับ โดยรูปแบบออร์แกนเจลได้เลือกใช้ชนิดเลซิทีนออร์แกนเจล (lecithin organogel) ที่ประกอบด้วยเลซิทีนเป็นสารก่อเจล ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวทำละลายเลซิทีน และเมื่อเติมสารละลายมีขี้ผึ้งในตำรับ มีผลให้เลซิทีนจัดเรียงตัวเป็นไมเซลล์ เกิดโครงร่างแหแบบสามมิติในออร์แกนเจลได้ เป็นรูปแบบที่ช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาและลดการเสื่อมสลายของยา<sup>8</sup> ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากผลการวิจัยนี้ จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่นำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับใช้ภายนอก และเป็นแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลจากสารสกัดใบรางจืดเพื่อใช้ศึกษาในขั้นถัดไปด้านการอักเสบในทางคลินิกต่อไป

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใบรางจืดด้วยเทคนิค HPTLC
2. ศึกษาเปรียบเทียบการตั้งตำรับเจลใช้ภายนอกจากสารสกัดใบรางจืด ในรูปแบบไฮโดรเจลและออร์แกนเจล

### วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดใบรางจืด นำใบรางจืด (จากจังหวัดฉะเชิงเทรา) มาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 45°C ก่อนบดเป็นผงหยาบ จากนั้นนำมาแช่หมัก (maceration) ในเอทานอล บนเครื่องกวนสารแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองกากทิ้งไป ระเหยสารสกัดให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) จะได้สารสกัดเอทานอลจากใบรางจืด คำนวณร้อยละของสารสกัด

2. การพัฒนาระบบ HPTLC เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบรางจืด โดยศึกษาเปรียบเทียบ แยกองค์ประกอบต่างๆ ในสารสกัดใบรางจืดและตรวจหาเอกลักษณ์ของสาร apigenin โดยใช้แผ่น HPTLC สำเร็จรูปที่เคลือบด้วย silica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck®) ด้วยระบบตัวทำละลาย 3 ระบบ ดังนี้

- ethyl acetate:formic acid:acetic acid (10:0.8:0.8 v/v/v) และตรวจสอบด้วย spraying reagent: AlCl<sub>3</sub>
- hexane:ethyl acetate:acetic acid (6.4:2.6:1 v/v/v) และตรวจสอบด้วย spraying reagent: fast blue salt

- toluene:ethyl acetate:formic acid (6:4:0.2 v/v/v) และตรวจสอบ quenching spot ภายใต้ UV 254 nm

จากผลการทดลองพบว่า ระบบที่เหมาะสมที่สามารถแยก apigenin ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ในสารสกัดใบรางจืด คือระบบ toluene:ethyl acetate:formic acid (6:4:0.2 v/v/v) จึงนำระบบนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดใบรางจืดด้วยเทคนิค HPTLC ต่อไป

### 3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ apigenin ในสารสกัดใบรางจืดด้วยเทคนิค HPTLC

**3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ apigenin** เตรียมสารละลายมาตรฐาน apigenin ในเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 1, 1.5, 2 และ 2.5  $\mu\text{g/mL}$  วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำด้วยเทคนิค HPTLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น toluene:ethyl acetate:formic acid (6:4:0.2 v/v/v) และสแกนพื้นที่ได้พิกที่ความยาวคลื่น 325 nm<sup>9</sup> สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน apigenin (แกน x) กับพื้นที่ได้พิกของ apigenin (แกน y) คำนวณหาค่า  $r^2$  (coefficient of determination)

**3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ apigenin ในสารสกัดใบรางจืด** ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ apigenin ในสารสกัดใบรางจืดโดยใช้ระบบตัวทำละลาย toluene:ethyl acetate:formic acid (6:4:0.2 v/v/v) และสแกนพื้นที่ได้พิกที่ความยาวคลื่น 325 nm คำนวณหปริมาณ apigenin ในสารสกัดใบรางจืดจากกราฟมาตรฐาน apigenin

### 4. การพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดใบรางจืด

**4.1 การตั้งตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารช่วยต่างๆ ที่ใส่ในตำรับไฮโดรเจลพื้น (hydrogel base) รวม 3 ตำรับ (H1, H2 และ H3 ในตารางที่ 1) โดยใช้ปริมาณสารก่อเจล Carbomer 934 ร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ menthol, isopropyl alcohol, sodium hydroxide, thymol และน้ำ ในอัตราส่วนความเข้มข้นต่างๆ แต่องค์ประกอบมีหน้าที่หรือมีส่วนช่วยให้ตำรับมีคุณสมบัติเหมาะสม ดังตารางที่ 1 แล้วทำการประเมินความเหนียวและลักษณะที่ปรากฏ เพื่อคัดเลือกตำรับเจลพื้นที่เหมาะสมที่สุดไปเตรียมตำรับไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมสารสกัดใบรางจืด

ในการเตรียมไฮโดรเจลพื้น แยกส่วนผสมของตำรับเป็น 2 ส่วนคือ ส่วน A (กระจาย Carbomer 934 ลงในน้ำ) กับส่วน B (ละลาย menthol และ thymol ใน isopropyl alcohol) ในการผสม แยกแต่ละส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมส่วน B ลงในส่วน A กวนด้วยเครื่องกวนสาร แล้วเติม sodium hydroxide ลงไป กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้เจลข้นเหนียวและวัดค่าความเป็นกรดต่าง

จากผลการศึกษาพบว่าตำรับไฮโดรเจลพื้น H1 และ H2 เป็นตำรับเจลพื้นที่มีคุณสมบัติที่ต้องการคือ มีความใส ความเหนียวดี ผิวหนังดี เคลือบง่าย จึงเลือกมาตั้งตำรับไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดใบรางจืด 0.5 %w/w โดยละลายสารสกัดใบรางจืดใน isopropyl alcohol แล้วค่อยๆ เทลงในตำรับตำรับไฮโดรเจลพื้นให้เข้ากัน ได้ตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืด H4 และ H5 (ตารางที่1) เมื่อเปรียบเทียบตำรับเจลทั้งสอง พบว่าตำรับ H4 มีลักษณะเนื้อเจลที่ต้องการ จึงคัดเลือกตำรับ H4 ไปประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพและหาปริมาณ apigenin ในตำรับต่อไป

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของตำรับไฮโดรเจลพื้นและไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืด

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)					หน้าที่
	ไฮโดรเจลพื้น		ไฮโดรเจล จากสารสกัดใบ รางจืด			
	H1	H2	H3	H4	H5	
สารสกัดใบรางจืด	-	-	-	0.5	0.5	active ingredient
Carbomer 934	1.2	0.9	0.6	1.2	0.9	gelling agent
Menthol	3	3	3	3	3	cooling agent, counter irritant
Isopropyl alcohol	11	11	11	11	11	cosolvent
Sodium hydroxide	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	neutralizing agent
Thymol	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	flavoring, preservative
DI water q.s. to	100	100	100	100	100	vehicle

**4.2 การตั้งตำรับออร์แกโนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารช่วยต่างๆ ที่ใส่ในตำรับออร์แกโนเจลพื้น (organogel base) รวม 4 ตำรับ (R1, R2, R3 และ R4 ในตารางที่ 2) โดยใช้ปริมาณสารก่อเจล Pluronic F-127 ในอัตราส่วนความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ lecithin, isopropyl palmitate, Germaben™II, thymol และน้ำ แล้วทำการประเมินความหนืดและลักษณะที่ปรากฏ เพื่อคัดเลือกตำรับเจลพื้นที่เหมาะสมที่สุดไปเตรียมตำรับออร์แกโนเจลจากสารสกัดใบรางจืด

ในการเตรียมออร์แกโนเจลพื้น แยกส่วนผสมของตำรับเป็น 2 ส่วนคือ ส่วน oil phase (ละลาย lecithin ใน isopropyl palmitate แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ lecithin ละลายได้อย่างสมบูรณ์) กับ ส่วน aqueous phase (ละลาย Pluronic F-127 และ Germaben™II ในน้ำเย็นและเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ Pluronic F-127 ละลายได้อย่างสมบูรณ์) จากนั้นค่อยๆ เติม oil phase ลงใน aqueous phase ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้เจลข้นหนืด

จากผลการศึกษาพบว่าตำรับออร์แกโนเจลพื้น R4 เป็นตำรับเจลพื้นที่มีคุณสมบัติที่ต้องการคือ มีความหนืดที่พอดี ทาบนผิวหนังได้ง่าย ทาแล้วแห้งไว จึงเลือกมาตั้งตำรับออร์แกโนเจลจากสารสกัดใบรางจืด 0.5 %w/w (R5) โดยละลายสารสกัดใบรางจืดใน absolute ethanol แล้วค่อยๆ เทลงในตำรับออร์แกโนเจลพื้น คนให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

**5. การทดสอบความคงตัวของตำรับไฮโดรเจลและออร์แกโนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ทำการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไฮโดรเจล (H4) และออร์แกโนเจลจากสารสกัดใบรางจืด (R5) ที่เก็บสลับอุณหภูมิ (อุณหภูมิสูง 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและอุณหภูมิต่ำ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) และเก็บในสภาวะต่างๆ (อุณหภูมิห้อง, 4°C, 40°C) เป็นเวลา 90 วัน คัดเลือกตำรับที่มีความคงสภาพดีมาวิเคราะห์หาปริมาณ apigenin ในตำรับด้วยเทคนิค HPTLC (ข้อ 3.2)

**6. การทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจลและออร์แกโนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ทำการทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจลและออร์แกโนเจลจากสารสกัดใบรางจืดในอาสาสมัคร 35 คน (ผ่านการ

พิจารณาเห็นชอบโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เลขที่รับรอง อ.1047/2563) ในหัวข้อรูปแบบผลิตภัณฑ์ กลิ่น สี การกระจายตัว ความชุ่มชื้นต่อผิว ความระคายเคือง และความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์

**ตารางที่ 2** ส่วนผสมของตำรับออร์แกนเจลพื้นและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)					หน้าที่
	ออร์แกนเจลพื้น				ออร์แกนเจลจาก	
	R1	R2	R3	R4	สารสกัดใบรางจืด	
Rangchuet extract	-	-	-	-	0.5	active ingredient
Lecithin	3	3	3	3	3	permeation enhancer
Isopropyl palmitate	12	12	12	12	12	emollient
Pluronic F-127	20	16.67	15	13	13	surfactant
Germaben™ II	1	1	1	1	1	preservative
DI water q.s. to	100	100	100	100	100	solvent

**7. การทดสอบความระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ทำการทดสอบความระคายเคืองด้วยวิธี patch test ในอาสาสมัคร 35 คน (ผ่านการพิจารณาเห็นชอบโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เลขที่รับรอง อ.1047/2563) โดยอาสาสมัคร 1 คน จะได้รับทั้งตำรับไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืดเพื่อทดสอบบริเวณท้องแขนด้านในข้างซ้ายและขวา ตามลำดับ โดยก่อนทำการทดสอบ ให้เช็ดบริเวณที่จะทดสอบให้สะอาด ทาตำรับเจลขนาด 2x2 cm แล้วปิดทับด้วยพลาสติกกันน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแกะพลาสติกออก ล้างด้วยน้ำสะอาด รอแห้ง อ่านและบันทึกผลที่เกิดขึ้น สังเกตผลซ้ำหลังจากอ่านผลครั้งแรกครบ 24 ชั่วโมง ถ้ายังมีรอยแดงจะสังเกตต่อไปอีก 3-4 วัน ทำการบันทึกผลโดยให้คะแนนการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง ดังนี้ คะแนน 0 = ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง; 1 = ผิวหนังแดงเล็กน้อย; 2 = ผิวหนังแดงปานกลาง อาจมีการบวมที่ขอบและมีตุ่มนูนปรากฏ; 3 = ผิวหนังแดงปานกลาง มีตุ่มบวมนูน; 4 = ผิวแดงมาก มีตุ่มบวมนูนรุนแรงและอาจพบตุ่มน้ำใส และ 5 = มีปฏิกิริยาการแพ้อย่างรุนแรงลามออกไปรอบนอกบริเวณทดสอบ

## ผลการศึกษา

**การเตรียมสารสกัดรางจืด** ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบรางจืดที่เตรียมจากวิธีการหมักด้วยเอทานอล ได้สารสกัดที่มีลักษณะขุ่นหนืดสีเขียว เมื่อคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง มีค่าเท่ากับ 5.81

**1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ apigenin ในสารสกัดใบรางจืดด้วยเทคนิค HPTLC** จากผลการศึกษาเปรียบเทียบระบบ HPTLC 3 ระบบ พบว่าระบบที่เหมาะสมที่สามารถแยก apigenin ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ในสารสกัดใบรางจืด คือระบบ toluene:ethyl acetate:formic acid (6:4:0.2 v/v/v) ตามด้วยการตรวจสอบ quenching spot ภายใต้ UV 254 nm (ดังรูปที่ 1) เนื่องจากมีการแยก spot ของ apigenin ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ บนแผ่น HPTLC อย่างชัดเจน ไม่ทับซ้อนกันและมีค่า R<sub>f</sub> ที่เหมาะสม (0.39)

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของ apigenin โดยแกน x เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน apigenin ที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 1, 1.5, 2 และ 2.5  $\mu\text{g/mL}$  แกน y เป็นค่าเฉลี่ยของ peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC (ระดับละ 3 ซ้ำ) ดังตารางที่ 3 ได้สมการเส้นตรง  $y = 17464x + 751.39$  และมีค่า  $r^2 = 0.9895$

จากข้อมูลข้างต้น นำไปใช้คำนวณหาปริมาณของ apigenin ในสารสกัดใบรางจืด พบว่าสารสกัดใบรางจืด 1 g มีปริมาณ apigenin 206.52 mg และจากผลการศึกษาทางพรีคลินิก พบว่าการใช้ topical apigenin 0.67 mg/kg สามารถบรรเทาอาการผิวหนังอักเสบในหนู<sup>7</sup> หากนำมาในคน (60 kg) จะใช้สารสกัดใบรางจืดราว 0.2 g ในการศึกษาเบื้องต้นนี้ ได้ทดลองเตรียมตำรับใช้ภายนอกในรูปแบบเจลที่มีส่วนผสมสารสกัดใบรางจืดในปริมาณ 0.5 %w/w

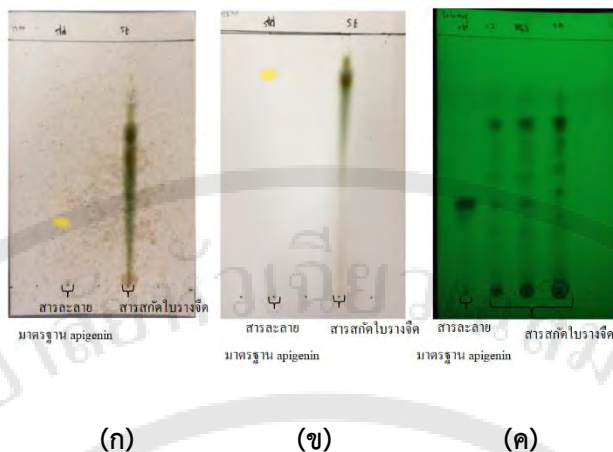
## 2. การพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดใบรางจืด

**2.1 ตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืด** จากการพัฒนาตำรับไฮโดรเจลพื้นโดยปรับเปลี่ยนปริมาณของสารก่อเจล Carbomer 934 ในปริมาณ 0.6 - 1.2 %w/w พบว่าตำรับไฮโดรเจลพื้น H1 (Carbomer 934, 1.2%) และ H2 (Carbomer 934, 0.9 %) ให้ลักษณะเนื้อเจลที่ดี จึงเลือกมาตั้งตำรับไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดใบรางจืด 0.5 %w/w ได้ตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืด H4 และ H5 (ตารางที่1) ตำรับ H5 ที่ได้มีเนื้อเจลเหลว ในขณะที่ตำรับ H4 มีความข้นหนืดเหมาะสมคือไม่เหลวหรือข้นมากเกินไป จึงคัดเลือกตำรับ H4 ไปประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพและหาปริมาณสารสำคัญ apigenin ในตำรับต่อไป

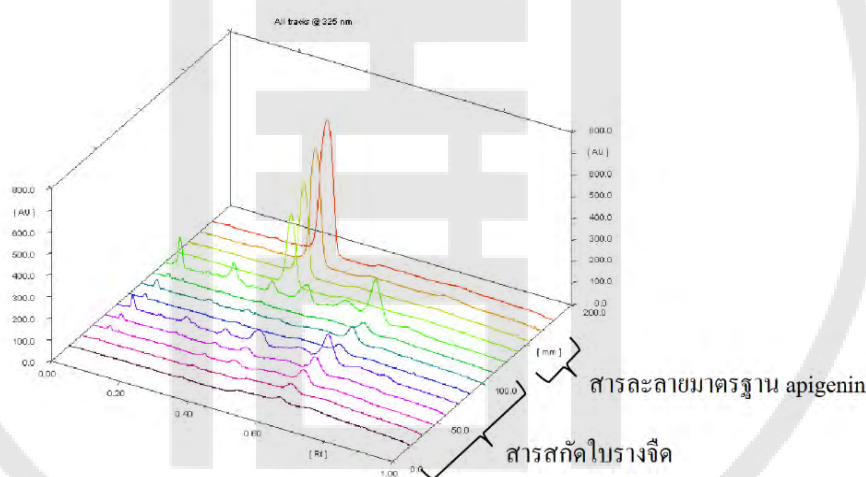
**2.2 ตำรับออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ได้ทำการศึกษาใช้ Pluronic F-127 เป็นสารก่อเจลในปริมาณ 13% - 20% โดยน้ำหนัก ร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆ พบว่าตำรับออร์แกนเจลพื้น R4 (Pluronic F-127, 13%) ให้ลักษณะเนื้อเจลที่ดี จึงนำมาใช้ในการตั้งตำรับออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด R5

**3. การทดสอบความคงตัวของตำรับไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ผลการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของตำรับไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืดก่อนการทดสอบความคงตัว ณ สภาวะต่างๆ โดยใช้ประสาทสัมผัส พบว่ามีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกัน มีกลิ่นเฉพาะ สีเขียว เนื้อเนียน กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6

ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืด H4 ในสภาวะเร่ง พบว่าขณะที่ทดสอบที่อุณหภูมิ 45°C เจลจะหลอมเหลว และหลังจากทดสอบสภาวะเร่งแล้ว พบว่าเจลที่ได้ลักษณะเหลวเล็กน้อย สำหรับตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืดที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพในสภาวะควบคุมอุณหภูมิต่างๆ ยังคงมีลักษณะทางกายภาพเหมือนเดิมไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนความเป็นกรดต่างของตำรับที่ผ่านการทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ตำรับที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพที่อุณหภูมิ 4°C และ 40°C เป็นเวลา 90 วัน มีค่าความเป็นกรดต่างของตำรับเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (pH=5) และพบว่าตำรับไฮโดรเจลจากสารสกัดใบรางจืด (H4) 1 กรัมที่ผ่านการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง มีปริมาณ apigenin 0.0103 mg



**รูปที่ 1** HPTLC chromatograms ของสารสกัดใบรางจืดกับสารละลายมาตรฐาน apigenin โดยใช้ระบบตัวทำละลาย และวิธีตรวจสอบแตกต่างกัน (ก) DVS = ethyl acetate:formic acid:acetic acid (10:0.8:0.8 v/v/v) และตรวจสอบด้วย  $\text{AlCl}_3$  (ข) DVS = hexane:ethyl acetate:acetic acid (6.4:2.6:1 v/v/v) และตรวจสอบด้วย fast blue B salt (ค) DVS = toluene:ethyl acetate:formic acid (6:4:0.2 v/v/v) และตรวจสอบด้วย UV 254 nm



**รูปที่ 2** 3D-HPTLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน apigenin และสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่พัฒนา (toluene:ethyl acetate:formic acid (6:4:0.2 v/v/v) และสแกนที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร

สำหรับตำรับออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด R5 ที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่ง และสภาวะควบคุมอุณหภูมิต่างๆ พบว่ามีลักษณะทางกายภาพและค่าความเป็นกรดต่างเหมือนเดิมไม่เปลี่ยนแปลงและมีปริมาณ apigenin 0.0174 mg ในตำรับออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด (R5) 1 กรัมที่ผ่านการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง

**4. การทดสอบความพึงพอใจต่อตำรับไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** จากการทดสอบความพึงพอใจต่อตำรับไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืดในอาสาสมัคร 35 คน (ชาย 11 คน หญิง 24 คน ช่วงอายุ 18 - 25 ปี) พบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่มีความพึงพอใจต่อตำรับทั้งสองรูปแบบในระดับปาน



กลางและมีความพึงพอใจโดยรวมต่อตำรับไฮโดรเจล มากกว่าตำรับออร์แกนเจล เนื่องจากในตำรับไฮโดรเจลมี menthol เป็นส่วนประกอบ ให้ความรู้สึกเย็นและกลิ่นที่ดีกว่าตำรับออร์แกนเจล

**ตารางที่ 3** ปริมาณสาร apigenin ในสารสกัดใบรางจืดและพื้นที่ใต้พีคจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC

สาร	ปริมาตร spot (µL)	ปริมาณ apigenin (µg)	พื้นที่ใต้พีค apigenin			
			n1	n2	n3	ค่าเฉลี่ย
Standard apigenin	0.3	0.06	1459.1	1383.0	1778.0	1540.0 ± 209.57
	1.0	0.2	4652.8	4470.5	4516.4	4546.6 ± 94.82
	1.5	0.3	6334.5	6199.5	6329.7	6287.9 ± 76.59
	2.0	0.4	7375.8	7376.1	7375.9	7375.9 ± 0.15
	2.5	0.5	9606.5	9356.5	9549.3	9504.1 ± 130.99
สารสกัดใบรางจืด (conc. 32.2 mg/mL)	15	6.65	2428.3	2526.9	2522.7	2492.6 ± 55.75

**5. การทดสอบความระคายเคืองของตำรับไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืด** ผลการทดสอบความระคายเคืองของตำรับไฮโดรเจลและออร์แกนเจลจากสารสกัดใบรางจืดด้วยวิธี patch test ในอาสาสมัคร 35 คน โดยทาทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีอาสาสมัครคนใดที่เกิดการระคายเคือง

#### สรุปและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาทางพรีคลินิกพบว่า apigenin ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมากในใบรางจืด มีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดีและในปัจจุบันมักใช้สารสกัดรางจืดในรูปแบบใช้ภายใน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เตรียมตำรับใช้ภายนอกจากสารสกัดใบรางจืดเพื่อบรรเทาอาการอักเสบ โดยใช้รูปแบบไฮโดรเจลและเลซีทินออร์แกนเจล รวมทั้งได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ apigenin ด้วยเทคนิค HPTLC ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และมีความจำเพาะต่อ apigenin ข้อมูลที่ได้จากผลการวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่นำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดรางจืดเพื่อใช้ศึกษายืนยันฤทธิ์ด้านการอักเสบในทางคลินิกต่อไป

จากการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความคงสภาพของตำรับทั้ง 2 รูปแบบที่พัฒนาได้ ณ สภาวะเร่งและที่สภาวะควบคุมอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 90 วัน พบว่าสูตรตำรับทั้งสองที่มีส่วนผสมของสารสกัดรางจืดมีความคงสภาพดี และรูปแบบตำรับออร์แกนเจลอาจช่วยเพิ่มปริมาณยาในความเข้มข้นสูงกว่ารูปแบบไฮโดรเจล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zia H และคณะ<sup>10</sup> ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ลักษณะของตำรับที่มีส่วนผสมของสารสกัดรางจืดมีสีเขียวเข้ม ทำให้ไม่น่าใช้ หากมีการพัฒนาการเตรียมสารสกัดโดยกำจัดสีออกไปบางส่วน จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมมากขึ้นและเป็นการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสำคัญ apigenin ในสารสกัดด้วย

### เอกสารอ้างอิง

1. ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ (BGO Plant Databases, The Botanical Organization [อินเทอร์เน็ต] เชียงใหม่: ศูนย์วิจัยและพัฒนาสง่า สรรพศรี องค์การสวนพฤกษศาสตร์ [ปรับปรุงเมื่อ 8 Nov 2015]. เข้าถึงเมื่อ 9 เมษายน 2565. เข้าถึงได้ <http://www.qsbg.org/>.
2. พร้อมจิต ศรีลัมพ์. รางจืด สมุนไพรแก้พิษและล้างพิษ. [อินเทอร์เน็ต] กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล [เข้าถึงเมื่อ 12 เม.ย. 2565] เข้าถึงได้จาก: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0046.pdf>
3. Jungsi M, Siripongvutikorn S, Yupanqui CT, Usawakesmanee W. Phenolic and flavonoid compounds in aqueous extracts of *thunbergia laurifolia* leaves and their effect on the toxicity of the carbamate insecticide methomyl to murine macrophage cells. *Funct. Foods Health Dis.* 2017; 31;7(7):529-44.
4. Sultan KW, Chatterjee S, Roy A, Chandra I. An Overview of Ethnopharmacological and phytochemical properties of *Thunbergia* sp. *Med Aromat Plants.* 2015;4(217), 2167-0412
5. Pramyothin P, Chirdchupunsare H, Rungsipat A, Chaichantipyuth C. Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn extract in rats treated with ethanol: in vitro and in vivo studies. *J Ethnopharmacol.* 2005;102(3):408-11.
6. Lee JH, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch Pharmacol research.* 2007; 30(10):1318-27.
7. Man MQ, Hupe M, Sun R, Man G, Mauro TM, Elias PM. Topical apigenin alleviates cutaneous inflammation in murine models. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;1:2012.
8. Wattanasri P, Opanasopit P. Organogel for Transdermal Drug Delivery systems. *Thai Bull. Pharm. Sciences.* 2018;13(1):93-104.
9. Chamandy A, Zhao M, Rammal H, Ennahar S. Hyphenated LC-ABTS+ and LC-DAD-HRMS for simultaneous analysis and identification of antioxidant compounds in *Astragalus emarginatus* Labill. extracts. *J Pharm Anal.* 2022;12(2):253-62.
10. Zia H, Attar Nasser A, Aboofazeli R, Needham T. Lecithin-Stabilized Microemulsion-Based Organogels for Topical Application of Ketorolac Tromethamine. II. In vitro Release Study. *Iran. J Pharm Res.* 2010;20(2):117-24.