4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม โดยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วย chloroform ethanol และน้ำ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแตกต่างกัน สังเกตได้จากขนาดของ inhibition zone ซึ่งอาจเป็นเพราะสารที่อยู่ในเปลือกผลทับทิมอาจจะละลายในน้ำและ chloroform ได้ไม่ดีเท่ากับละลายใน ethanol ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแตกต่างกันและในการทดสอบจะใช้แผ่น disc ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งซึ่งผลการทดสอบให้ขนาดของ inhibition zone ใกล้เคียงกัน แต่แบบแผ่นเปียกให้ขนาดของ inhibition zone กว้างกว่าแผ่นแห้งเล็กน้อย Voravuthikunchai และคณะ (2004b) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของสมุนไพรไทย 58 ชนิด กับเชื้อ enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 พบเพียง 24.14% ของสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ต้าน Gram-negative bacteria ส่วน Ahmad และคณะ (1998) รายงานค่าของสารสกัดหยาบด้วย alcohol จากเปลือกผลทับทิม (ความเข้มข้น 200 mg/ml) ต่อเชื้อ *E. coli* K-12 และ *P. aeruginosa* ATCC 25619 มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 10 ถึง 19 mm ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ และรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Gram-negative bacteria เช่น *Vibrio cholerae* (Guevara *et al.*, 1994), *E. coli* (Navarro *et al.*, 1996; Prashanth *et al.*, 2001), *P. aeruginosa* (Navarro *et al.*, 1996) และ *K. pneumoniae* (Prashanth *et al.*, 2001) นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Gram-positive bacteria ได้ เช่น *B. subtilis*, *S. aureus* (Prashanth *et al.*, 2001; Holetz *et al.*, 2002) และ methicillin-resistant *S. aureus* ได้ (Machado *et al.*, 2002)

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีในเบื้องต้น ได้แก่ สารสกัดหยาบด้วย ethanol มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี agar dilution โดยใช้ millipore filter membrane พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 3.13 mg/ml และ 3.13 ถึง 25 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกันกับการ

ศึกษาของ Voravuthikunchai และคณะ (2004b) ส่วน Navarro และคณะ (1996) และ Prashanth และคณะ (2001) รายงานค่าของสารสกัดหยาบด้วย methanol จากเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *E. coli* มีค่า MIC เท่ากับ 10 และ 12 mg/ml ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่าค่า MIC (0.39 ถึง 3.13 mg/ml) ที่ได้มีค่าที่ดีกว่ามาก ค่าที่แตกต่างกันคงเป็นเพราะชนิดของ solvent ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดสารและวิธีการสกัดสาร ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับศักยภาพการออกฤทธิ์ของสมุนไพร ได้แก่ แหล่งที่เก็บ สภาวะแวดล้อมในการเพาะปลูกซึ่งอาจทำให้สารที่มีอยู่ในสมุนไพรมีปริมาณต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำพืชสมุนไพรมาสกัดแต่ละครั้ง กลุ่มสารสำคัญที่แยกได้มีปริมาณต่างกัน (Nimiri *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999) เนื่องจากสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีจึงนำมาสกัดให้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ และนำเฉพาะ fraction ที่มีสารปริมาณมากคือ ethyl acetate และ *n*-butanol fractions มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC พบว่าสามารถต้านเชื้อที่นำมาทดสอบได้ดีกว่าส่วนสกัดหยาบด้วย ethanol โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.02 ถึง 0.78 mg/ml และ 0.19 ถึง 6.25 mg/ml ตามลำดับ

จากผลการทดสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol พบองค์ประกอบได้แก่ flavonoids, tannins, sterols และ triterpenes รายงานการศึกษาของ Husain และคณะ (1992) พบ alkaloids, tannins และ glycosides เป็นสารสำคัญในเปลือกผลทับทิม Poyrazoglu และคณะ (2002) พบว่ามีสารพวก organic acids และ phenolic compounds ในผลทับทิม มีรายงานว่า tannins (Bruyne *et al.*, 1999; Chattopadhyay *et al.*, 2002), flavonoid (Lak, 1987) และ sterols (Sharma, 1993; Ramesh *et al.*, 2001) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ทั้ง Gram-positive และ Gram-negative ดังนั้นการที่สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Gram-negative ได้นั้น อาจเนื่องจากสารสำคัญพวก tannins, flavonoid และ sterols

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการทำให้เกิดโรคของจุลินทรีย์ที่สำคัญ คือ การเกาะติดกับ receptor ที่ผนังเซลล์ของ host (Straube *et al.*, 1993; Vranes *et al.*, 1994) โดยอาศัย specific adhesins ซึ่งในแบคทีเรียกรัมลบจะอยู่ที่ fimbriae, pili (pilus adhesion) และ receptor ของ host (Gibbson, 1992) เกาะกันด้วย hydrophobic force เช่น

เชื้อกลุ่ม EHEC มีกลไกการก่อโรคโดยใช้ fimbriae ในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุลำไส้แล้วสร้าง VT ออกมา (Torres and Kaper, 2003) ซึ่งจากการศึกษาสามารถทดสอบ cell surface hydrophobicity ของจุลินทรีย์และผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อ aggregative properties ของเชื้อ โดยใช้วิธี salt aggregation test (SAT) พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol, ethyl acetate fraction และ *n*-butanol fraction ไปมีผลในการเพิ่มการเกิด aggregation กับเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งตัวเชื้อมีลักษณะเป็น autoaggregative ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่าสมุนไพรไปมีผลต่อการเกิด aggregation การที่สารสกัดจากสมุนไพรทำให้ hydrophobicity เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกันเองซึ่งทำให้เชื้อถูกขับออกโดยกระบวนการของร่างกายได้ง่ายหรือทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกำจัดเชื้อได้ง่ายขึ้น ดังเช่นจากการทดลองของ Turi และคณะ (1997) พบว่าสารสกัดจาก bearberry ด้วยน้ำไปมีผลต่อการเพิ่ม hydrophobicity และ aggregation ของแบคทีเรียกรัมลบและจากการศึกษาของ Annuk และคณะ (1999) พบว่าสารสกัดจาก bearberry และ cowberry สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อจะเพิ่ม hydrophobicity ให้แก่เชื้อทำให้เกิด aggregation ส่วนสารสกัดจาก wild camomile และ pineapple-weed ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจะยับยั้งการเกิด aggregation ด้วย นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่นำมาทดสอบมี tannin เป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถต้านจุลินทรีย์ได้ (นิจศิริและพยอม, 2534; พเยาว์, 2537; Nimiri *et al.*, 1999) จากการศึกษาของ Turi และคณะ (1999) พบว่าปริมาณของ tannin มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อโดยสารที่มี tannin มากจะยับยั้งเชื้อได้ดีและทำให้เกิด aggregation จากลักษณะของ tannin ที่สามารถตกตะกอนโปรตีนและมีคุณสมบัติเป็นยาฝาดสมาน (astringent) ทำให้ tannin สามารถยับยั้งกลไกการเกิดท้องร่วงได้ โดย tannin จะตกตะกอนโปรตีนที่ผนังลำไส้ที่ถูกทำลายจากพิษของแบคทีเรียทำให้มีการปิดทับบาดแผลและเกิดการสร้างเนื้อเยื่อภายในทดแทนทำให้กลไกท้องร่วงถูกยับยั้ง (สรศักดิ์, 2531) จากรายงานของ Otshudi และคณะ (2000) ที่กล่าวว่าพืชที่มี tannin มักใช้ในการรักษาโรคท้องร่วงและบิดได้ผล ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่เปลือกผลทับทิมมีผลดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้

ในการรักษาการติดเชื้อ EHEC ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญที่ก่อให้เกิดอาการไตล้มเหลวและโรคเกี่ยวกับสมอง (encephalopathy) ซึ่ง Verocytotoxin (VT) หรือ Shiga-like toxins เป็นสาเหตุที่สำคัญในการก่อโรค ซึ่งเชื้อจะปล่อย Verocytotoxin ออกมาในระหว่างการรักษา EHEC ด้วยยาปฏิชีวนะ Yoh *et al.* (1999) ได้ทดลองให้เห็นว่า subinhibitory concentrations ของ quinolones กระตุ้นการสร้าง VT1 และ VT2 ของเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสกัด ethyl acetate fraction และ *n*-butanol fraction จากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol มาทดสอบผลต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งการปล่อยสารพิษทั้ง 2 ชนิด คือ VT1 และ VT2 เพื่อหาค่า Verocytotoxin (VT) titer โดยใช้ reversed passive latex agglutination (RPLA) assay ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1/10 MIC, MIC และ 10 MIC พบว่าสารสกัดแยกส่วนทั้ง 2 fraction มีผลให้เชื้อปล่อย VT1 และ VT2 ลดลง 4 ถึง 16 เท่าและ 32 เท่า ตามลำดับ รายงานก่อนหน้านี้ทดสอบฤทธิ์ของ creosote สารพวก phenolic compound และสารสกัดจากกานพลู (clove) มีผลยับยั้งการผลิต Verocytotoxin (VT1 และ VT2) จาก *E. coli* O157: H7 (Sakagami *et al.*, 1999, 2000) ดังนั้นจึงควรพิจารณาด้วยว่าสารสกัดและความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้นั้นมีผลไปเพิ่มหรือกระตุ้นการปล่อยสารพิษของเชื้อหรือไม่

จากผลการทดสอบเมื่อนำ ethyl acetate fraction จากเปลือกผลทับทิมมาวิเคราะห์หาสารสำคัญโดยใช้ LC-MS พบว่ามีสารกลุ่ม punicalagin, punicalin, สารกลุ่ม flavonoids ซึ่งอาจเป็น luteolin, quercetin, kaempferol และ/หรือกลุ่ม anthocyanins (cyanin, delphinine) หรือ glycosides ของ flavonoids และสารกลุ่ม sterol อาจเป็น stigmasterol ในระหว่างการสกัดอาจทำให้ punicalagin ถูกย่อย (hydrolyze) บางส่วนไปทำให้ไม่เห็น peak ที่สำคัญ m/z ที่ 1083 จะเห็นเพียง peak ที่ต่ำลงมาก่อนที่จะถูกย่อยจนถึง punicalin m/z ที่ 781 (M^+- H) รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเปลือกผลทับทิมมีสารสำคัญ ดังนี้ punicalagin (80 ถึง 85% w/w), punicalin, gallagic acid, ellagic acid (1.3% w/w) และ ellagic acid-glycosides (hexoside, pentoside, rhamnoside etc.) (Gil *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2002; Cerda *et al.*, 2003; Seeram *et al.*, 2005)

เนื่องจากทับทิมเป็นพืชสมุนไพรหาได้ง่ายในท้องถิ่น ราคาไม่แพงและสกัดง่าย ดังนั้นจึงควรศึกษาต่อในรายละเอียดสำหรับสารส่วนที่มีฤทธิ์ดี เพื่อที่จะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาต้านแบคทีเรียต่อไป