



## รายงานฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาตำรับแกรนูลขงละลายน้ำจากน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมเพื่อใช้ยับยั้ง  
เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

Development of Water-soluble Granule from Pomegranate Rind

Water Extract against Gastrointestinal Bacterial Pathogens

กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย  
Thai Traditional Medical Knowledge Fund

โดย ผศ.ดร.บรรลือ สังข์ทอง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พฤษภาคม 2564

## บทคัดย่อ

**บทนำ:** ในปัจจุบันประชาชนไทยเริ่มดูแลสุขภาพและใส่ใจสุขภาพมากขึ้น และที่สำคัญ คือ การรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ จะเห็นได้ว่าประชาชนหันมารับประทานผัก ผลไม้ กันเป็นจำนวนมาก ซึ่งทับทิมเป็นผลไม้ อีกชนิดหนึ่งที่อุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีหลากหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ในทางการแพทย์พื้นบ้านมีการใช้เปลือกผลทับทิมรักษาอาการท้องเสียและโรคบิด เนื่องจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ฝาดสมาน ในบัญชียาหลักแห่งชาติ บัญชียาจากสมุนไพร ในกลุ่มยาบรรเทาอาการท้องเสีย ที่ใช้เปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใสเป็นน้ำกระสายยา โดยใช้เป็นน้ำกระสายยาสำหรับละลายยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร ดังนั้นการพัฒนาสารสกัดตามภูมิปัญญา หากสามารถพัฒนาแกรนูลชันละลายน้ำจากน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิม ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร หรือสามารถนำแกรนูลชันดังกล่าวไปขงเป็นน้ำกระสายยาสำหรับละลายยาธาตุบรรจบหรือยาเหลืองปิดสมุทร ทำให้ผู้ป่วยใช้ได้ง่าย ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการใช้ยาแผนไทยเพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน

**วิธีดำเนินการวิจัย:** ตัวอย่างผลทับทิมแก่ (peel of the ripe fruit) สายพันธุ์ไทยจาก จ.มหาสารคาม ทำการสกัดด้วยน้ำกระสายยาสองชนิดเปรียบเทียบกันคือ การต้มเดือดด้วยน้ำ และ ต้มเดือดด้วยน้ำปูนใส ทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวมและวิเคราะห์สารบ่งชี้สำคัญกรดเอลาจิก นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดทับทิมด้วยวิธี Disc diffusion method และ Broth microdilution method รวมทั้งตั้งตำรับผลิตภัณฑ์รูปแบบแกรนูล ควบคุมคุณภาพทั้งทางจุลชีววิทยา กายภาพและทางเคมี

**ผลการศึกษาวิจัย:** ตัวอย่างเปลือกผลทับทิมที่เก็บใน อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคามและนำมาสกัดพบว่ามีย่อยละผลผลิตจากการสกัดด้วยน้ำเป็น  $54.20 \pm 0.97$  และการสกัดด้วยปูนใสเป็น  $41.43 \pm 0.50$  มีปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำเป็น  $769.04 \pm 76.12$   $\mu\text{g}$  gallic acid equivalence/1 mg สารสกัดเปลือกผลทับทิม และสารสกัดน้ำปูนใสเป็น  $20.95 \pm 3.97$   $\mu\text{g}$  gallic acid equivalence/1 mg การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนินรวมของสารสกัดน้ำเป็น  $4,490.83 \pm 218.33$   $\mu\text{g}$  tannic acid equivalence/1 g สารสกัดเปลือกผลทับทิม และสารสกัดน้ำปูนใสเป็น  $1,420.00 \pm 25.00$   $\mu\text{g}$  tannic acid equivalence/1 g สารสกัดเปลือกผลทับทิม การวิเคราะห์ปริมาณสาร ellagic acid ด้วย HPLC พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีค่าเท่ากับร้อยละ  $0.2109 \pm 0.0089$  และตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำปูนใส เท่ากับร้อยละ  $0.0679 \pm 0.0083$  (ร้อยละ/น้ำหนักแห้ง)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่า สารสกัดน้ำมีค่าการยับยั้งเฉพาะเชื้อ Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และเกิดเป็น clear zone ขนาด  $0.73 \pm 0.06$  เซนติเมตร ส่วนสารน้ำปูนใสมีค่าการยับยั้งเฉพาะเชื้อ Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เกิดเป็น clear zone ขนาด  $0.23 \pm 0.40$ ,  $0.23 \pm 0.40$  และ  $0.47 \pm 0.40$  เซนติเมตร ซึ่งมีค่าการยับยั้งเชื้อที่ต่ำ ส่วนการทดสอบกับยามาตรฐาน Norfloxacin ( $10 \mu\text{g}$ ) และ Ampicillin ( $10 \mu\text{g}$ ) มี clear zone ระหว่าง  $1.40 - 2.00$  เซนติเมตร และ  $0.70 - 1.60$  เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนค่า MIC และ MBC ของเชื้อ *E. coli* ชนิดต่าง ๆ โดยค่า MIC อยู่ระหว่าง  $15.625 - 125$  mg/ml (สำหรับสารสกัดน้ำ) และ  $62.5 - 250$  mg/ml (สำหรับสารสกัดน้ำปูนใส) ส่วนค่า MBC มีความเข้มข้นที่สูงในการฆ่าเชื้อสำหรับสารสกัดน้ำ ( $\geq 500$  mg/ml) และสำหรับสารสกัดน้ำปูนใส ( $>1,000$  mg/ml) การศึกษาการยับยั้งเชื้อ (MIC) และการฆ่าเชื้อ (MBC) *H. pylori* สำหรับสารสกัดน้ำปูนใส มีค่า  $2.083$  และ  $3.333$  mg/ml และสำหรับสารสกัดน้ำ มีค่า  $0.260$  และ  $0.417$  mg/ml จะเห็นได้ว่าสารสกัดทับทิมด้วยน้ำมีค่าความเข้มข้นสำหรับการยับยั้งเชื้อ (MIC) และการฆ่าเชื้อ (MBC) *H. pylori* ที่ต่ำ แสดงว่ามีฤทธิ์ดีใช้สารสกัดปริมาณน้อยก็สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้

การพัฒนาตำรับสารสกัดเปลือกผลทับทิมพบว่าสารสกัดน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ทดสอบได้ดีกว่า สารสกัดน้ำปูนใส จึงนำมาพัฒนาตำรับแกรนูลขงละลายน้ำที่มีรสชาติดี โดยการนำแกรนูล 2 กรัม ละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีส้มอมน้ำตาลอ่อนมีตะกอน รสชาติหวานอมเปรี้ยว มีค่า pH เฉลี่ย  $2.58 \pm 0.01$  ร้อยละความชื้นเฉลี่ย  $7.93 \pm 1.34$  มีการไหลของแกรนูลที่ดี (angle of repose เป็น  $33.50 \pm 0.21$  องศา) ค่า การปนเปื้อน Total Aerobic Microbial Count (TAMC) คิดเป็น 366.7 cfu/g ซึ่งไม่เกินมาตรฐาน THP สำหรับการทดสอบความคงตัวนั้นผลิตภัณฑ์ต้นแบบแกรนูลขงละลายน้ำมีความคงตัวดีภายใต้การทดสอบ สภาวะเครียด (Stress condition)

**สรุปผลการทดลอง** ผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่พัฒนาขึ้นในรูปแบบแกรนูลขงละลายน้ำจากน้ำกระสายยา เปลือกผลทับทิม โดยพัฒนาจากสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร และตำรับที่พัฒนาได้มีความคงตัวดีทางจุลชีววิทยา กายภาพและทางเคมี แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ต้นแบบ ที่พัฒนาขึ้นมานั้นมีจำเป็นจะต้องมีการศึกษาความคงตัวแบบเร่ง และการศึกษาระยะยาว รวมทั้งการศึกษา การใช้แกรนูลจากสารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำเพื่อใช้เป็นน้ำกระสายยาในสำหรับตำรับยาแผนไทยที่ใช้ใน การรักษาอาการท้องเสีย เช่น ยาธาตุบรรจบ หรือยาเหลืองปิดสมุทร ทั้งในสัตว์ทดลอง หรือการทดลองทาง คลินิกต่อไป

คำสำคัญ: แกรนูลขงละลายน้ำ เชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร น้ำกระสายยา สารสกัดเปลือกผลทับทิม



## Abstract

**Introduction:** Recently, health care of Thai population are increasingly concerned, especially healthy food diet. Pomegranate is one of a phytochemicals-rich fruits beneficial for human body. In traditional medicines, pomegranate rind is used for the treatment of diarrhea from its astringent property. As mentioned in National List of Essential Medicines; List of Herbal Medicinal Product of anti-diarrheal drug, pomegranate decoction with lime water is used as vehicle for “Ya That Banchop” and “Ya Lueang Pit Samut”. Therefore, development of the pomegranate extract granule derived from traditional wisdom was carried out against gastrointestinal bacterial pathogens. The obtained granule could be used as a vehicle for “Ya That Banchop” and “Ya Lueang Pit Samut”. It also increased patient compliance as well as promoting the use of Thai Traditional medicine.

**Method:** Peels of the ripe Thai pomegranate were harvest from Maha Sarakham Province. They were extracted using decoction with water and lime water. Then, the extracts were dried using freeze drying technique. The extracts were also determined total phenolic content, total tannin content and the amount of ellagic acid. Additionally, anti-gastrointestinal pathogens using Disc diffusion method and Broth microdilution method were also performed. Finally, a water-soluble granule from pomegranate rind water extract was also developed and determined microbiological, physical and chemical properties of the product.

**Results:** The extraction yield of pomegranate rind using water and lime water decoction techniques were  $54.20 \pm 0.97\%$  and  $41.43 \pm 0.50\%$ . Total phenolic content of water and lime water extracts were  $769.04 \pm 76.12 \mu\text{g}$  gallic acid equivalence/1 mg and  $20.95 \pm 3.97 \mu\text{g}$  gallic acid equivalence/1 mg, respectively. Total tannin content of water and lime water extracts were  $4,490.83 \pm 218.33 \mu\text{g}$  tannic acid equivalence/1 g and  $1,420.00 \pm 25.00 \mu\text{g}$  tannic acid equivalence/1 g. The amount of ellagic acid from HPLC method were  $0.2109 \pm 0.0089\%$  and  $0.0679 \pm 0.0083\%$  for water and lime water extract.

The anti-bacterial activities of extracts were tested against various strains of *E. coli* using disc diffusion method. The water extract inhibited Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) with clear zone at  $0.73 \pm 0.06$  cm. In addition, the lime water extract was active against Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) with clear zone at  $0.23 \pm 0.40$ ,  $0.23 \pm 0.40$  and  $0.47 \pm 0.40$  cm. The extracts were also carried out comparing with Norfloxacin (10  $\mu\text{g}$ ) and Ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ) with clear zone between 1.40 – 2.00 cm and 0.70 – 1.60 cm, respectively. MIC of the extracts against various strains of *E. coli* ranging from 15.625 – 125 mg/ml (for water extract) and 62.5 – 250 mg/ml (from lime water extract). MBC of the water extract was relatively high with  $\geq 500$  mg/ml and  $>1,000$  mg/ml for the lime water extract. In case of *H. pylori*, MIC and MBC of lime water extract was ranged between 2.083 - 3.333 mg/ml and for water extract ranging between 0.260 - 0.417 mg/ml. Comparing all result, MIC and MBC of *H. pylori* exhibited the best activities at low concentration.

Development of pomegranate rind water extract possesses a better inhibitory activities against bacteria than the lime water extract. Therefore, the water extract was further developed for granule. The granule was dissolved at 2 g per 100 ml and observed physical appearance, orange-brown color with small particles. The pH of the solution was  $2.58 \pm 0.01$  and the moisture content was  $7.93 \pm 1.34\%$ . The angle of repose of the granule was  $33.50 \pm 0.21$  degree. Total aerobic microbial count (TAMC) was 366.7 cfu/g and complied to the THP standard. For stability test, the prototype of pomegranate extract granule exhibited a good stability under the stress condition.

**Conclusion:** The prototype of extract granule from pomegranate rind possessed anti-gastrointestinal pathogens. The product exhibited a good stability in microbiology, physical and chemical properties. However, the developed product are required for accelerate and long-term stabilities. For further studies, pomegranate rind water extract can be tested in combination with “Ya That Banchop” and “Ya Lueang Pit Samut” in animal model or in clinical study.

Key words: water soluble granule, gastrointestinal pathogens, vehicle, pomegranate rind extract

