

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีออกซาและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาโปธาดูและการศึกษาความคงตัว

ธนกานต์ กิจนิธิประภา*, สุมาลี ปานทอง†,§, อินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ†, สุมาลี คอนโด†

*หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

†สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

‡สถานวิทยาศาสตร์ฟิสิกส์คลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

§ผู้รับผิดชอบบทความ: psumalee@tu.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ตำรับยาโปธาดูที่ 21 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสียหลายชนิด และมีสารองค์ประกอบหลักคือ brazilin และ gallic acid แต่ยังไม่เคยมีการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียดีออกซาปฏิชีวนะ รวมถึงความคงตัวของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีออกซาและปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมีชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจาก brazilin และ gallic acid มาก่อน วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาโปธาดูที่ 21 ในการยับยั้งเชื้อ extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* หรือ ESBL-*E. coli* และปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ความคงตัวของสารสกัดภายใต้สภาวะเร่ง

วิธีการศึกษา: ตำรับยาโปธาดูถูกสกัดด้วยวิธีการต้มน้ำ จากนั้นจึงนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค broth microdilution assay และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี สารสกัดถูกทดสอบความคงตัวภายใต้สภาวะเร่งโดยการทดสอบเป็นเวลา 6 เดือน โดยสารสกัดจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

ผลการศึกษา: สารสกัดตำรับยาโปธาดูที่ 21 มีฤทธิ์ยับยั้ง ESBL-*E. coli* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.625–2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดคือสาร protosappanin B โดยมีปริมาณ 2.89 ± 0.21% w/w เมื่อทำการทดสอบความคงตัวของสารสกัดพบว่าสารสกัดตำรับยาโปธาดูที่ 21 มีความคงตัวในการออกฤทธิ์โดยพบว่าฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร protosappanin B เมื่อทดสอบความคงตัวในวันที่ 120 แต่เมื่อผ่านไป 180 วันพบว่าปริมาณสารดังกล่าวไม่มีความแตกต่างจากวันที่เริ่มต้นทำการทดสอบ

อภิปรายผล: สารสกัดตำรับยาโปธาดูที่ 21 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อตัวยาปฏิชีวนะได้ แต่สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ protosappanin B ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้า อาจเป็นเพราะความแตกต่างของฤดูกาลและสภาพอากาศซึ่งมีผลต่อปริมาณสารเคมีในสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับทำให้สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักเปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและมีความคงตัวของ

การออกฤทธิ์ แต่ปริมาณสารไม่คงตัวซึ่งอาจเกิดจากความชื้นและอุณหภูมิในการทดสอบความคงตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในตำรับ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ESBL-*E. coli* ที่ได้และมีปริมาณสารองค์ประกอบหลักคือสาร protosappanin B โดยหลังจากทดสอบความคงตัวเป็นเวลา 180 วัน สารดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับวันที่ 0 อย่างไรก็ตาม ปริมาณสาร protosappanin B มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะเร่งที่ 120 วัน ดังนั้น สารสกัดดังกล่าวควรมีการเก็บรักษาในที่อุณหภูมิและความชื้นต่ำเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญ ในการนำยาตำรับดังกล่าวไปใช้ควรต้องมีการทดสอบความเป็นพิษก่อนที่จะนำไปทดสอบประสิทธิผลในคนต่อไป

คำสำคัญ: มะขามป้อม, ฝาง, ตำรับยาอาโปธาตุ, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ยาสมุนไพร

Inhibition Effect on Antibiotic Resistant Bacteria and Protosappanin B Content in A-Po-That Formula Extract and Stability Testing

Thanakan Kitnithiprapha^{*}, Sumalee Panthong^{†,§}, Intouch Sakpakdeejaroen[†], Sumalee Kondo[‡]

^{*}Master of Science Program in Applied Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[†]Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[‡]Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[§]Corresponding author: psumalee@tu.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: The 21st A-Po-That traditional drug formula exhibits antibacterial activity against many bacteria that cause diarrhea and its main chemical constituents are brazilin and gallic acid. But there have been no studies on its effects on antibiotic-resistant bacteria and its stability in inhibiting antibiotic-resistant bacteria, as well as its other chemical compounds. The objectives of the study were to examine the antibacterial effects of 21st A-Po-That extract against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* or ESBL *E. coli*, analyze its chemical composition and assess the stability of the extract under accelerated conditions.

Methods: Extraction of the A-Po-That remedy was performed using a water decoction method. Subsequently, the antibacterial activity of the extract was assessed by the broth microdilution assay, while the chemical composition was quantified using the HPLC approach. The A-Po-That remedy extract was examined for stability under accelerated conditions for 6 months and tested/analyzed for antibacterial activity and chemical compounds.

Results: The 21st A-Po-That remedy extract was found to exhibit antibacterial activity against ESBL *E. coli* with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.625 to 2.5 mg/mL. Protosappanin B was the primary chemical constituent of the A-Po-That extract with a chemical concentration of $2.89 \pm 0.21\%$ w/w. The stability testing revealed that the A-Po-That extract exhibited stability in terms of its antibacterial activity and a change in its protosappanin B content after 120 days of testing. However, there was no significant difference in the content of protosappanin B between day 180 and day 0.

Discussion: The 21st A-Po-That remedy extract effectively suppressed the growth of ESBL *E. coli*. However,

the primary chemical compound identified was protosappanin B, which differs in contrast to what was previously reported. Seasonal and climatic changes may have an impact on the chemical composition of the remedy's medicinal plant ingredients. Furthermore, the *A-Po-That* extract exhibited consistent antibacterial activity, but displayed different results in terms of chemical composition. The changes in moisture and temperature might be contributing to the changing chemical composition of the remedy.

Conclusions and Recommendation: The findings indicate that the *A-Po-That* formula extract has the ability to inhibit ESBL *E. coli* growth with protosappanin B being identified as its main chemical compound. After undergoing stability testing for 180 days, the concentration of protosappanin B remained unchanged compared to day 0. However, the concentration of protosappanin B exhibited increased after 120 days. Thus, it is necessary to store *A-Po-That* extract in conditions of low temperature and low humidity to prevent any alteration of its chemical elements. Before performing any efficacy study of the *A-Po-That* formula in patients, it is necessary to perform a toxicity study first.

Key words: *Phyllanthus emblica*, *Caesalpinia sappan*, *A-Po-That* formula, anti-bacterial activity, herbal medicine

บทนำและวัตถุประสงค์

ปัญหาเชื้อดื้อยาเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขทั่วโลก โดยในปี พ.ศ. 2562 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศให้ปัญหาเชื้อดื้อยาเป็นหนึ่งในปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อประชากรและเป็นสิ่งที่ประเทศต่าง ๆ ควรเฝ้าระวัง^[1] จากการรายงานความชุกของการพบแบคทีเรียดื้อยาพบว่า เชื้อ *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus species*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhea* และ extended-spectrum beta-lactamase-producing (ESBL) เป็นเชื้อดื้อยาที่พบมากที่สุด^[2] ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว จะผลิตเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase ที่สลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้ เช่น ยา penicillin, monobactam และ cefotaxime^[3] สำหรับในประเทศไทยพบมีการรายงานการพบเชื้อดื้อยาในกลุ่ม ESBL ซึ่งเมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่า

เป็นเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีอัตราการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วงระยะเวลา 7 ปี^[4] และยังพบเชื้อชนิดนี้เพิ่มมากขึ้นในโรงพยาบาลราชบุรี โรงพยาบาลเชิงคำ และโรงพยาบาลพัทลุง โดยความชุกของเชื้อร้อยละ 57.2, 30.7 และ 33.44 ตามลำดับ^[5-7] เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคท้องเสียที่เกิดการกลายพันธุ์และดื้อยาเพิ่มมากขึ้นมากเป็นอันดับหนึ่ง^[8] โดยผู้ป่วยมักจะได้รับเชื้อชนิดนี้จากทางน้ำ อาหาร การใส่สายสวนปัสสาวะในโรงพยาบาล หรือจากระบบสุขาภิบาลในโรงพยาบาล ทำให้ปัจจุบันเชื้อดื้อยาชนิดนี้มีการแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น^[9]

กลไกของโรคท้องเสียตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย ในคัมภีร์ธาตุบรรจบกล่าวว่า โรคดังกล่าวมีสาเหตุจากการรับประทานอาหารผิดแปลก การรับประทานอาหารที่มากเกินไป รับประทานของหมักดอง ทำให้กระทบต่อธาตุไฟและธาตุลมให้มีกำลังน้อยลง และส่งผลให้ระบบย่อยอาหารผิดปกติไป ความผิดปกติดังกล่าวจะกระทบต่อธาตุน้ำและส่งผลให้ธาตุ

น้ำมีกำลังมากขึ้น จึงทำให้มีอาการถ่ายเหลว และกระหน่ำต่อธาตุดินเป็นธาตุสุดท้าย ทำให้การบีบตัวของลำไส้ผิดปกติ^[10] โดยตำรับยาที่เกี่ยวข้องกับการใช้รักษาโรคท้องเสียนั้นมีปรากฏในตำราพระโอสถพระนารายณ์ โดยมีชื่อตำรับยาว่า ตำรับยาอาโปธาตุที่ 21 ซึ่งตามคัมภีร์ได้ระบุให้เอาเปลือกมะขามป้อมฝางเสน ต้ม 4 เอา 1 กิน แก่ตักมูกตกหนักหยุดเป็นอันที่เพียงพอ ได้แก้ออกจากความตายเป็นมาหลายคนแล้ว^[11] ตำรับยานี้มีรสฝาด สามารถกระตุ้นการทำงานของธาตุไฟและธาตุลมให้เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ธาตุน้ำมีกำลังน้อยลง และรสฝาดยังสามารถรักษาธาตุดิน ลดการบีบตัวของลำไส้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดชั้นน้ำตำรับยาอาโปธาตุที่ 21 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *S. aureus* และ *Bacillus subtilis* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อและความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย อยู่ในช่วง 0.156-1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร^[12] แต่ยังไม่เคยมีรายงานการทดสอบกับเชื้อดื้อยาในกลุ่ม ESBL มาก่อน ในส่วนของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับยาอาโปธาตุคือ แก่นฝางและเปลือกต้นมะขามป้อมนั้น พบว่า มีข้อกำหนดเกี่ยวกับคุณภาพของผลมะขามป้อมที่ระบุไว้ในตำรายาสมุนไพรไทยที่ระบุว่าผลมะขามป้อมจะต้องประกอบด้วยสาร tannin ไม่ต่ำกว่า 20% แต่ไม่พบข้อมูลทางด้านคุณภาพของเปลือกต้นมะขามป้อมและแก่นฝางในตำราดังกล่าว^[13] อย่างไรก็ตามพบข้อมูลของฝางถูกระบุในตำรายาสมุนไพรของจีนว่าประกอบด้วยสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ brazilin และยังพบสารสำคัญอีกหลายชนิดคือ

sappanchalcone, sappanone A, sappanone B, and 3-hydroxysappanone B, caesalpin J, protosappanin A, protosappanin B และสารในกลุ่ม homoisoflavonoid^[14-15] สารสำคัญในฝางที่เป็นสารออกฤทธิ์หลักและสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้คือ brazilin^[16] นอกจากนั้นยังพบว่าสาร protosappanin A และ sappanone B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน แต่มีฤทธิ์น้อยกว่า brazilin^[17] ในส่วนของเปลือกต้นมะขามป้อมนั้นพบว่ามีรายงานระบุว่าประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่ม polyphenols และ tannin ได้แก่ gallic acid, ellagic acid, chebulagic acid^[18] ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย^[19-21] จากข้อมูลเบื้องต้นของตำรับและงานวิจัยที่ผ่านมาของสมุนไพรทั้งสองชนิดรวมถึงสารสำคัญที่พบในสมุนไพร จึงเป็นไปได้ว่าตำรับยาอาโปธาตุสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ESBL-*E. coli* ได้ นอกจากการทดสอบฤทธิ์ของตำรับยาดังกล่าวแล้วในการพัฒนาสารสกัดไปสู่ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในปัจจุบันนั้น จะต้องมีการดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในตำรับรวมถึงการวิเคราะห์ความคงสภาพของสารสกัดดังกล่าวให้เป็นไปตามข้อกำหนดขององค์การอาหารและยา^[22]

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* กลุ่ม ESBL ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุที่ 21 และศึกษาปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ศึกษาความคงตัวของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุภายใต้สภาวะเร่งเพื่อช่วยสนับสนุนข้อมูลการนำตำรับยาดังกล่าวไปใช้และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

ตัวอย่างสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 2 ชนิด คือ เปลือกต้นมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) และแก่นฝาง (*Caesalpinia sappan*) เปลือกต้นมะขามป้อมได้รับมาจากจังหวัดปทุมธานี และแก่นฝางได้รับมาจากจังหวัดสุพรรณบุรี โดยมะขามป้อมจะนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ที่พิพิธภัณฑ์พืชสมุนไพรสิรินธร กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยมีเลขอ้างอิงพันธุ์พืชเลขที่ BK No.085336. ส่วนแก่นฝางจะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์เปรียบเทียบกับตัวอย่างสมุนไพรที่พิพิธภัณฑ์พืชมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตามเลขอ้างอิงเลขที่ SKP098031901

2. วิธีการศึกษา

2.1 การสกัดสาร

นำสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปตากให้แห้งและบดเป็นผงหยาบ ซึ่งสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดในสัดส่วนที่เท่ากัน จากนั้นทำการเตรียมด้วยวิธีที่คล้ายกับที่ระบุในตำรา^[11] โดยการนำสมุนไพรตำรายาไปธาตุมาทำการสกัดด้วยวิธีการต้ม (decoction) โดยนำผงสมุนไพรมาทำการเติมน้ำ 4 ส่วน ต้มเดือดเป็นเวลา 15 นาที ให้กรองสารสกัดออกแล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่กรองแล้วมาเคี่ยวให้เหลือ 1 ส่วน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution assay โดยใช้ rezasurin เป็นอินดิเคเตอร์^[23] เชื้อ ESBL-*E. coli* ที่

ใช้ในการทดสอบ มีทั้งหมด 21 สายพันธุ์ได้รับมาจากรองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี คอนโด มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์โดยเชื้อทั้งหมดได้ผ่านการวิเคราะห์เพื่อหาสายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงของยีนส์มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้^[24] และนำมาทดสอบกับ ยาปฏิชีวนะ ampicillin ตามเกณฑ์มาตรฐานของ EUCAST ซึ่งกำหนดไว้ว่าหากทดสอบยาปฏิชีวนะ ampicillin ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และได้ค่า MIC สูงกว่า 8 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะถือว่าเชือดังกล่าวมีการดื้อยาปฏิชีวนะ^[25] โดยเชื้อ ESBL-*E. coli* ทั้งหมดจะถูกนำมาทดสอบเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ก่อนนำไปทดสอบกับสารสกัด โดยซึ่งมีรายละเอียดของเชื้อจุลินทรีย์ (Table 1)

Table 1 Description of ESBL-*E. coli*^[24]

Code	Resistance gene patterns
EC sk 3	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i>
EC sk 8	
EC sk 89	
EC sk 91	
EC sk 4	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i>
EC sk 6	
EC sk 11	
EC sk 76	
EC sk 83	
EC sk 85	
EC sk 23	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CXT-M}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i>
EC sk 77	
EC sk 20	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CXT-M}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i>
EC 190 sk 56	
EC 388 sk100	
EC 410 sk101	
EC sk 82	<i>bla_{TEM}</i>
EC 359 sk93	
EC sk 80	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i>
EC sk 81	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CXT-M}</i>
EC 490 sk114	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CXT-M}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i>

จากนั้นเชื้อทั้งหมดถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อเชื้อ 1-2 โคโลนีใส่ลงในอาหาร Muller Hinton broth (MHB) และทำการบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง และนำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (1×10^8 CFU/mL) จากนั้นนำมาเจือจางด้วย Muller Hinton broth ในอัตราส่วน 1:100 เพื่อนำไปทดสอบกับสารสกัดในส่วนของการเตรียมสารสกัดนั้น ทำการเตรียมสารสกัดน้ำตำรับยาอาโปธาตุความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ deionized water เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำมากรองผ่านตัวกรองปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปเจือจางด้วยอาหาร MHB ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการเติมสารสกัดลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 μ L ต่อหลุม จากนั้นจึงปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ใส่ลงไป 50 μ L ต่อหลุม นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ทำการเติมสารละลาย resazurin (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมลงไป และนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC โดยค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเปลี่ยนสี จากนั้นทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ (MBC) หลังจากนั้นดูดสารละลายในหลุมที่ resazurin ไม่มีการเปลี่ยนสี ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar บ่ม 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และบันทึกค่า MBC โดยค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

2.3 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบปริมาณองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและการตรวจวัดปริมาณสารสำคัญในสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุ

ในการวิเคราะห์จะใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของ Shimadzu-HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) รุ่น modular Shimadzu LC-40 system โดยมีส่วนประกอบของเครื่องได้แก่ LC-40D solvent delivery module และ SPD-M40 Photo Diode Array detector โดยใช้โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์คือ โปรแกรม LabSolutions software

ในการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์ยี่ห้อ Phenomenex Luna รุ่น 5 μ C18 (2) 100A analytical column (250 $\times$ 4.60 mm 5 microns) ที่ต่อกับ C18 guard column โดยใช้ mobile phase คือ 0.1% phosphoric acid (A) และ acetonitrile (B) โดยใช้รูปแบบการผสมสารละลายแบบ gradient elution ตามอัตราส่วนดังนี้ 0-11 นาที, 95% A, 12-31 นาที, 85% A, 32-36 นาที, 75% A, 37-41 นาที, 0% A, 42 นาที, 0% A, 42.1-46 นาที, 95% A, 47 นาที, 95% A โดยกำหนดอัตราการไหลที่ 0.65 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดสารสำคัญที่ความยาวคลื่น 286 นาโนเมตร โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ก่อนการวิเคราะห์จะมีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยทำการทดสอบตาม The International Conference on Harmonization (ICH) guidelines โดยทำการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity), การทดสอบความแม่นยำ (accuracy), การทดสอบความเที่ยง (precision), การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจ

พบ (limit of detection, LOD) และการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)^[26]

ในการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) จะเริ่มจากการฉีดสารละลายมาตรฐานในความเข้มข้นที่ต่างกัน 6 ความเข้มข้น โดยฉีดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และนำค่าพื้นที่ใต้กราฟไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (y) และความเข้มข้นของสาร

มาตรฐาน (x) โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ที่คำนวณได้ควรมีค่ามากกว่า 0.999 สำหรับการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) จะทำการวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ได้แก่ ความเข้มข้น 50, 100, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการปิเปตเพิ่มเข้าไปในสารสกัดชั้นตำรับยาอาโปธาตุความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และนำมาคำนวณ % recovery โดยใช้สมการด้านล่าง

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ปริมาณสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด}-\text{ปริมาณสารสำคัญในตัวอย่าง}}{\text{ปริมาณสารสำคัญที่เติมลงไป}} \times 100$$

สำหรับการทดสอบความเที่ยง (precision) จะทำการเตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยระบบที่ต้องการทดสอบ โดยทำการทดลองซ้ำในวันเดียวกันทั้งหมด 3 ซ้ำ (intra-day) และทำการทดลองซ้ำระหว่างวัน 3 ซ้ำ (inter-day) จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยค่าที่ได้ต้องไม่เกิน 2% ในการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) จะทำการคำนวณโดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความเป็นเส้นตรงมาทำการคำนวณตามสูตรด้านล่าง

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times \text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ความชัน}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ความชัน}}$$

2.4 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดภายใต้สภาวะเร่ง

ซึ่งสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุใส่ในขวดแก้วปิดฝา และนำไปเก็บภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^\circ\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$ เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างสารสกัดตัวอย่างในช่วงวันที่ 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 ตัวอย่างที่ถูกเก็บจะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเพื่อดูความคงตัวของสารสกัด โดยหากสารสกัดมีฤทธิ์และปริมาณสารสำคัญคงที่ก็จะถือว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 ปี^[27]

2.5 การคำนวณทางสถิติ

ข้อมูลจะถูกแสดงในรูปของเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบทางสถิติด้วยวิธี paired- sample *t*-test โดยกำหนดค่า *p* value < 0.05 หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุและความคงตัวของฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหลังการทดสอบสารสกัดภายใต้สภาวะเร่ง

ในส่วนของการยับยั้งเชื้อของยาปฏิชีวนะ ampicillin นั้นพบว่าค่าที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึงมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่า MIC ที่ถือว่าเชื่อมีการดื้อยาดังกล่าว^[25] เมื่อนำสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุไปทำการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ผลที่ได้พบว่าสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุสามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.625-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 2) ภายหลังการนำสารสกัดที่ทดสอบภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$ เป็นระยะเวลา 6 เดือน ผลที่ได้พบว่าฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุมีค่าที่ค่อนข้างคงที่โดยพบว่าค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดมีการแปรผันไม่เกิน 1 ระดับความเจือจาง ในขณะที่การยับยั้งเชื้อบางชนิด เช่น EC sk 8, EC sk 89, EC sk 76 มีค่าคงที่

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ในการเริ่มการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ HPLC chromatogram ของสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุพบว่าสารสกัดดังกล่าวมี

ปริมาณสารที่เคลื่อนที่ออกมาในนาที่ที่ 23.330 สูงที่สุด และเมื่อทำการเทียบลักษณะของ UV visible spectrum ของ peak ดังกล่าวที่พบในสารสกัดกับ peak ของสารมาตรฐานในฐานข้อมูล และทำการยืนยันโดยใช้เทคนิค spiking พบว่าสารดังกล่าวคือ protosappanin B (Figure 1-2)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกวิเคราะห์สาร protosappanin B ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของตำรับ โดยผลการทดสอบความใช้ได้ของระบบการวิเคราะห์ในการใช้วิเคราะห์สาร protosappanin B ที่อยู่ในสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุนั้นพบว่าค่าความเป็นเส้นตรง, การทดสอบความแม่นยำและการทดสอบความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (Table 3-5) โดยพบว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบสาร protosappanin B มีค่าเท่ากับ 6.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของสารนี้มีค่าเท่ากับ 21.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 3)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร protosappanin B ที่มีอยู่ในสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีปริมาณ protosappanin B เท่ากับ $2.89 \pm 0.21\% \text{w/w}$ และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร protosappanin B ในสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุที่ทดสอบภายใต้สภาวะเร่งพบว่าภายหลังการทดสอบที่ระยะเวลา 6 เดือน ปริมาณสารดังกล่าวในวันที่ 180 มีค่าเท่ากับ $2.9 \pm 0.14\% \text{w/w}$ และไม่มีความแตกต่างจากวันที่ 0 แต่พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณสาร protosappanin B ในวันที่ 120 โดยพบว่ามีปริมาณเท่ากับ $3.42 \pm 0.09\% \text{w/w}$ (Figure 3)

Table 2 MIC and MBC values of Apop-taat extract (mg/mL)

Code	Day 0		Day 30		Day 60		Day 90		Day 120		Day 150		Day 180		ampicillin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
EC sk 3	1.25	5	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 8	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	2.5	2.5	1	1
EC sk 89	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 91	1.25	2.5	1.25	2.5	2.5	2.5	1.25	2.5	2.5	2.5	5	5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 4	1.25	2.5	1.25	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 6	1.25	5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	1.25	1.25	1.25	2.5	1.25	1.25	> 1	> 1
EC sk 11	1.25	1.25	1.25	2.5	1.25	1.25	2.5	5	1.25	2.5	2.5	5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 76	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25	2.5	1.25	1.25	> 1	> 1
EC sk 83	1.25	1.25	1.25	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 85	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1	1
EC sk 23	2.5	5	2.5	2.5	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 77	1.25	1.25	1.25	5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	> 1	> 1
EC sk 20	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC 190 sk 56	0.625	0.625	1.25	1.25	0.625	0.625	0.625	0.625	1.25	1.25	0.625	1.25	1.25	1.25	> 1	> 1
EC 388 sk100	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	> 1	> 1
EC 410 sk101	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.625	0.625
EC sk 82	1.25	5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC 359 sk93	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 80	2.5	5	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	> 1	> 1
EC sk 81	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	> 1	> 1
EC 490 sk114	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	1.25	2.5	1.25	1.25	> 1	> 1

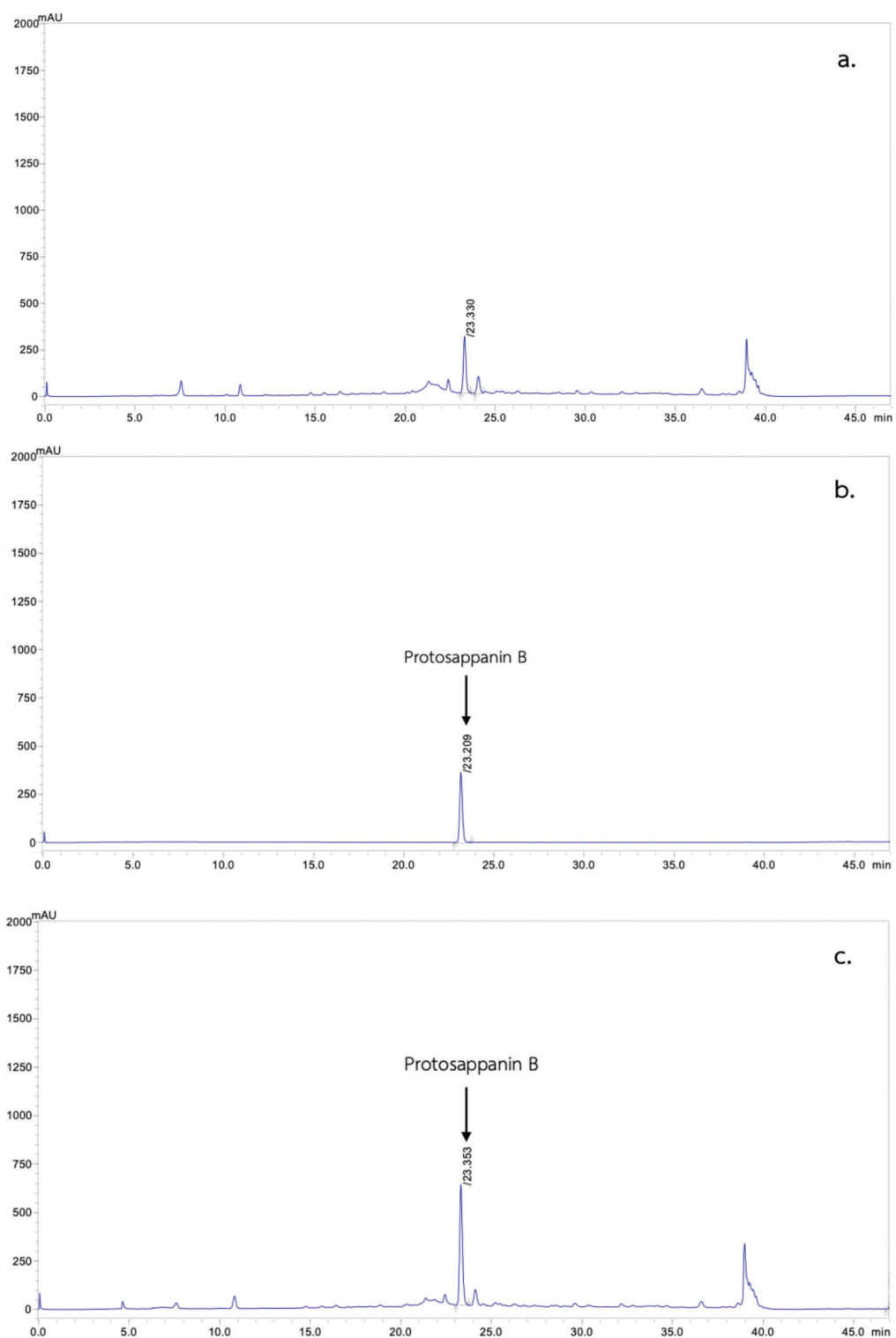


Figure 1 HPLC chromatogram of (a.) Apo-tha extract 5 mg/mL, (b.) protosappanin B 200 μ g/mL, and (c.) Apo-tha extract 5 mg/mL spike with protosappanin B 200 μ g/mL

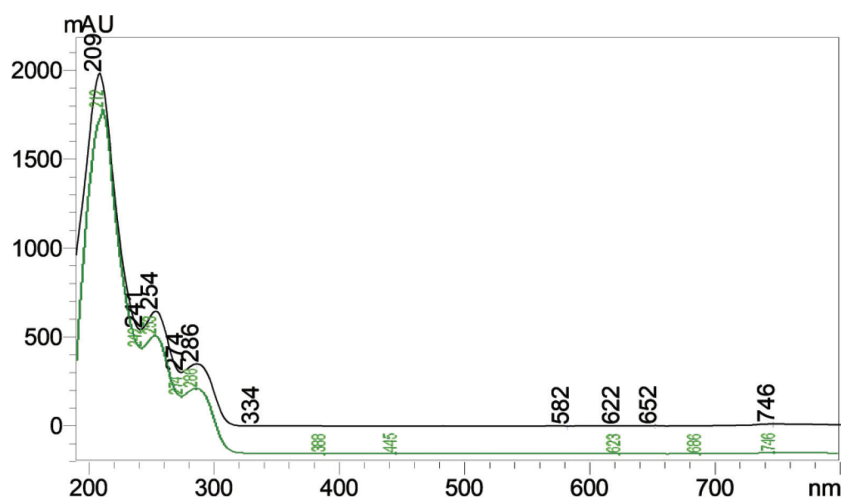


Figure 2 UV visible spectra of protosappanin B (black line) and protosappanin B in Apo-tha extract (green line)

Table 3 Linearity, correlation coefficient (r^2), limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) of calibration curves of protosappanin B in Apo-tha extract

Parameter	Protosappanin B
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	25-400
Regression equation ($y = ax + b$)	$Y = 19578x - 75563$
R^2	0.9999
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	6.39
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	21.3

Table 4 Intra-day and inter-day precision of protosappanin B

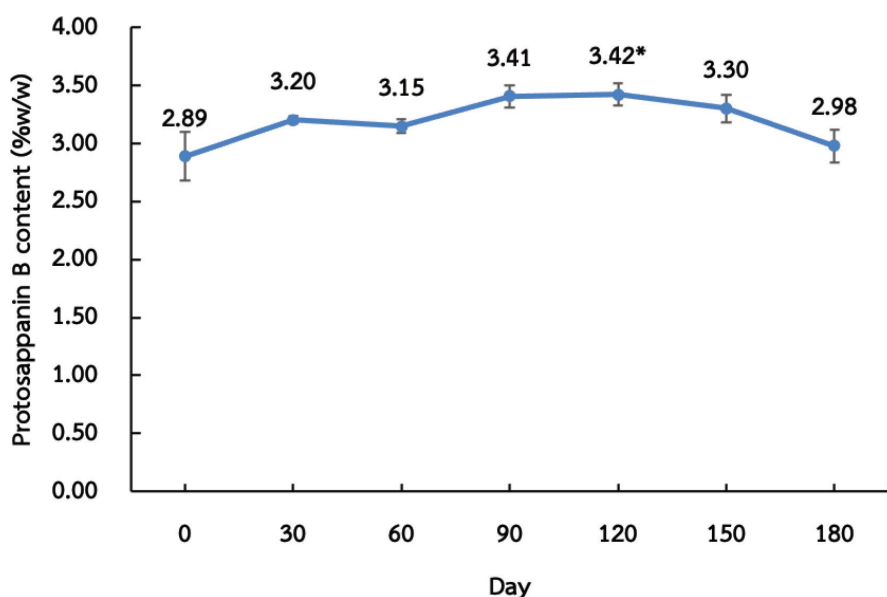
Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day ^a (n = 9)		Inter-day ^b (n = 9)	
		Measured Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	%RSD	Measured Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	%RSD
Protosappanin B	100	97.82 $\pm$ 1.05	1.07	96.7 $\pm$ 1.12	1.15
	200	199.07 $\pm$ 0.9	0.45	196.01 $\pm$ 3.35	1.71
	400	400.91 $\pm$ 5.1	1.27	394.84 $\pm$ 7.3	1.85

^aData was expressed as Mean $\pm$ S.D. and obtained by triplicate analyses in a consecutive run

^bData was expressed as Mean $\pm$ S.D. and obtained by triplicate analyses per day over 3 different runs

Table 5 Accuracy validation of the analytical method for protosappanin B

Sample	Spiked volume ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)			Mean $\pm$ %RSD
		N1	N2	N3	
Protosappanin B	50	104.18	104.67	101.11	103.32 $\pm$ 1.86
	100	93.63	91.57	90.99	92.06 $\pm$ 1.5
	200	93.44	95.12	94.87	94.48 $\pm$ 0.95

**Figure 3** Protosappanin B content at day 0 to 180 after stability testing (* p -value<0.05)

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอื่นๆ ที่สามารถพบได้ในตำรับคือ brazilin และ protosappanin B โดยใช้ระบบวิเคราะห์เดียวกันพบว่าสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุประกอบด้วยสารทั้งสองชนิดนี้โดยพบ peak ของสาร gallic acid

และ brazilin ในนาที่ 10.874 และ 24.097 แต่สารทั้งสองตัวนั้นมีปริมาณน้อยกว่า protosappanin B ซึ่งสังเกตได้จากความสูงของ peak ที่มีค่าต่ำกว่า peak ของ protosappanin B (Figure 4)

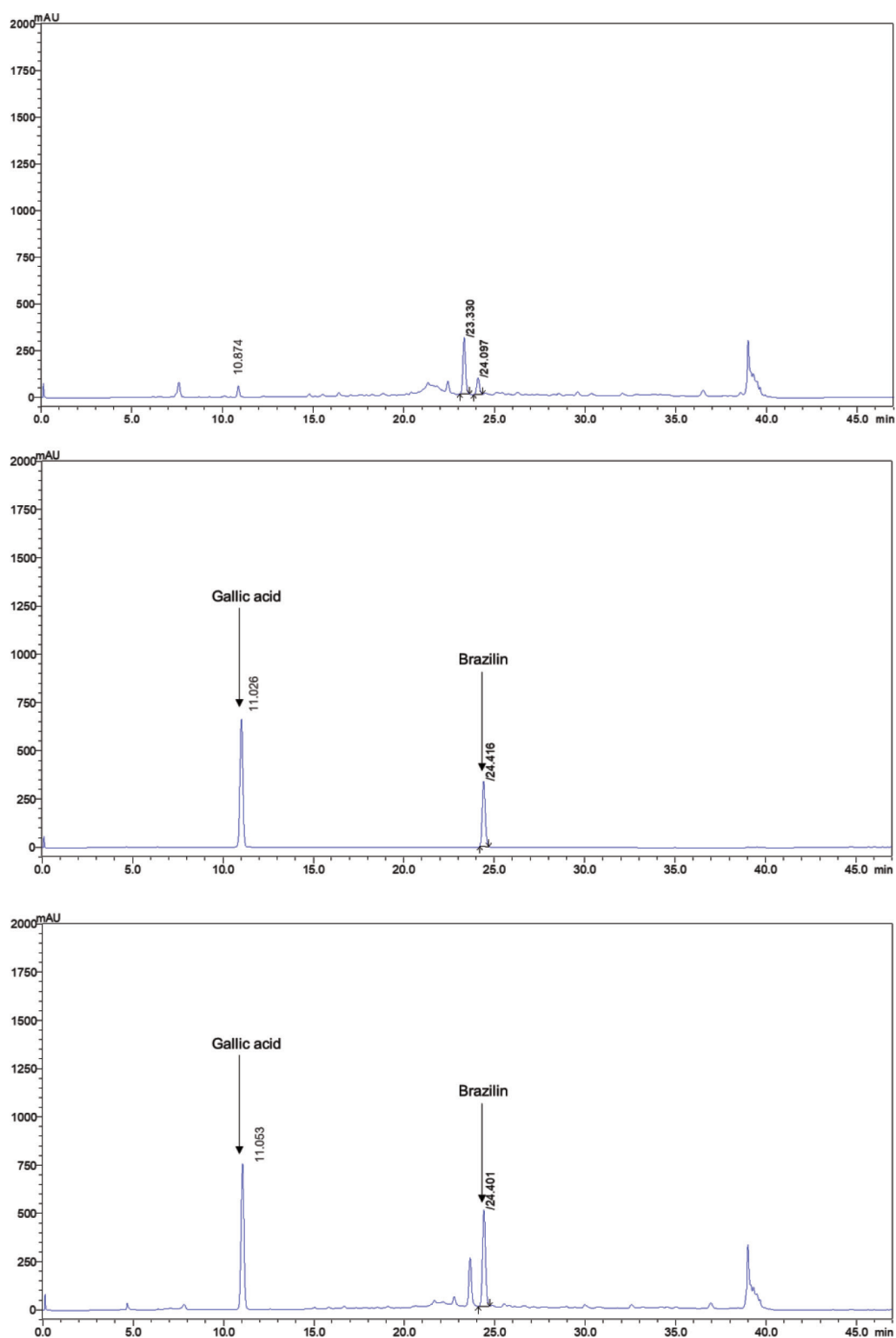


Figure 4 HPLC chromatogram of (a.) Apo-tha extract 5 mg/mL, (b.) gallic acid and brazilin 200 µg/mL, and (c.) Apo-tha extract 5 mg/mL spike with gallic acid and brazilin 200 µg/mL

อภิปรายผล

ตำรับยาอาโปธาตุที่ 21 เป็นตำรับยาที่ประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน 2 ชนิด คือ เปลือกมะขามป้อมและแก่นฝางนำมาต้มน้ำรับประทาน จากรายงานก่อนหน้านั้นพบว่าเมื่อนำตำรับยาดังกล่าวมาสกัดด้วยวิธีการต้มน้ำพบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC25922 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานได้ โดยมีสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ brazilin และ gallic acid^[12] ในการศึกษาครั้งนี้สารสกัดดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ โดยเชื้อ *E. coli* ที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อที่มีการกลายพันธุ์และมีการเปลี่ยนแปลงบนยีนหลายตำแหน่งส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิด^[28] แต่สารสกัดตำรับยาอาโปธาตุสามารถยับยั้งเชื้อดื้อยาที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักพบว่าสารองค์ประกอบหลักคือ protosappanin B ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าปริมาณของสาร brazilin เป็นองค์ประกอบหลักและพบสาร gallic acid รองลงมา^[12] สาร protosappanin B เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม homoisoflavonoid เช่นเดียวกับ brazilin ซึ่งสารดังกล่าวพบได้ในแก่นฝาง^[15,29] สารเคมีในกลุ่มของ homoisoflavonoid เช่น homoisoflavonone, 3-(4'-methoxybenzyl)-7,8-methylenedioxy-chroman-4-one มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านไวรัสและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม mycobacterial โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 16-256 $\mu\text{g/mL}$ ^[30] ในส่วนของสาร protosappanin B นั้น พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ methicillin-susceptible *S. aureus* และ

E. coli ATCC25922^[31] แต่ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารชนิดนี้ แต่คาดว่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์คล้าย ๆ กับสารชนิดอื่น ๆ ในกลุ่ม homoisoflavonoid ที่พบว่ามีการฆ่าเชื้อโดยการกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแตกและยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก^[30] นอกจากกลไกดังกล่าวแล้ว สาร protosappanin B อาจเกิดการยับยั้งเชื้อดื้อยาผ่านกลไกต่าง ๆ เช่น สามารถจับกับตัวรับหรือ active site บริเวณผนังเซลล์แบคทีเรียที่เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะและสามารถลดกลไกการขับยาออกนอกเซลล์ได้จึงเป็นสาเหตุให้สารสกัดตำรับยาอาโปธาตุสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้^[32] นอกจากนี้การที่พบสารองค์ประกอบหลักคือ protosappanin B แทนที่จะเป็น brazilin นั้นอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมและการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศเป็นเหตุผลหลักโดยมีงานวิจัยพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในพืชมีความแตกต่างกัน แม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันและเก็บในฤดูกาลเดียวกันแต่คนละปี ซึ่งความแตกต่างของปริมาณสารฟลาโวนอยด์นั้นอาจเกิดจากอุณหภูมิของสภาวะอากาศในแต่ละปีมีค่าที่แตกต่างกัน และช่วงเวลาที่พระอาทิตย์ขึ้นและตกที่ไม่เท่ากันในแต่ละปี ส่งผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีในพืชจึงทำให้ปริมาณสารเคมีอย่างฟลาโวนอยด์มีค่าแตกต่างกันเมื่อเก็บคนละช่วงเวลา^[33] จึงทำให้ในการศึกษาครั้งนี้พบสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้การทดสอบความคงตัวของสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาของสารสกัดดังกล่าวมีค่าคงที่โดยสังเกตได้จากค่า MIC ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 พบว่ามีค่าคงที่

หรือเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 1 ระดับความเฝ้าระวังตามข้อกำหนดของ the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases^[34] แสดงให้เห็นได้ว่าสารสกัดมีความคงตัวในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ในส่วนความคงตัวของปริมาณสารเคมีพบว่า ปริมาณสาร protosappanin B ในสารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 และ 180 พบว่าสารดังกล่าวมีปริมาณ protosappanin B ไม่แตกต่างจากวันที่ 0 แต่การเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเกิดขึ้น ณ วันที่ 120 ที่พบว่าปริมาณสาร protosappanin B มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวันที่ 0 โดยที่สารดังกล่าวมีปริมาณสูงขึ้น โดยตามเกณฑ์ของ ICH Harmonised Tripartite Guideline ได้ระบุว่าในการทดสอบความคงตัวของสารสกัดภายใต้สภาวะเร่ง หากพบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลาใดก็ตามแสดงว่าสารดังกล่าวไม่คงตัว และควรเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิต่ำและความชื้นต่ำ^[27] แต่จากการที่ฤทธิ์ของสารสกัดยังคงมีค่าคงที่ในทุกช่วงเวลาในขณะที่ปริมาณสารองค์ประกอบหลักมีการเปลี่ยนแปลงในบางช่วงเวลานั้น อาจมีเหตุผลจากการออกฤทธิ์ของตำรับดังกล่าวเกิดจากฤทธิ์ของสารองค์ประกอบทางเคมีในตำรับหลายๆ ตัวที่ออกฤทธิ์ร่วมกันซึ่งมักจะพบได้บ่อยเมื่อมีการใช้สมุนไพรหลายชนิดร่วมกันในการทดสอบและพบว่าทำให้มีฤทธิ์ดีขึ้นกว่าการใช้สมุนไพรเพียงชนิดเดียว^[35] ตำรับยาอาโปธาตุเป็นตำรับที่มีการใช้สมุนไพร 2 ชนิดร่วมกัน ดังนั้นการออกฤทธิ์ของตำรับยาดังกล่าวก็อาจจะเกิดจากสารองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดออกฤทธิ์ร่วมกัน โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในมะขามป้อมคือ gallic acid ในขณะที่ฝางพบ

brazilin เป็นองค์ประกอบหลัก^[12] gallic acid ที่พบในเปลือกต้นมะขามป้อมสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ^[36] นอกจากนั้นสาร brazilin ที่พบในแก่นฝาง ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียผ่านกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน^[37] โดยตำรับยาอาโปธาตุที่ทำการศึกษาค้างนี้พบว่าประกอบด้วยสาร gallic acid และ brazilin เหมือนกับรายงานก่อนหน้า^[12] แต่จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC chromatogram และยืนยันผลด้วยการเทียบกับสารมาตรฐานทั้งสองชนิดพบว่าตำรับยาอาโปธาตุที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยสาร gallic acid และ brazilin ในปริมาณน้อยกว่าสาร protosappanin B ซึ่งอาจเกิดจากช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างคนละช่วงเวลาจึงทำให้ได้องค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน แต่ถึงแม้องค์ประกอบทางเคมีจะแตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา แต่สารสกัดตำรับยาอาโปธาตุยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ESK-*E. coli* อาจเป็นไปได้ว่า การที่มีสารออกฤทธิ์หลายๆ ชนิดร่วมกันทำให้สารสกัดตำรับยาอาโปธาตุยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แม้จะมีปริมาณของสาร protosappanin B เปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองนี้ยังไม่มีการระบุถึงเกณฑ์ควบคุมคุณภาพในด้านของปริมาณสารเคมีที่ควรพบในสมุนไพรเหมือนกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ที่ถูกระบุค่ามาตรฐานของปริมาณสารเคมีไว้ในตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย^[13] เมื่อพิจารณาจากข้อมูลของงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าฝางที่สกัดด้วยวิธีต้มน้ำประกอบด้วยสาร brazilin อยู่ในช่วง 11.14-14.89%w/w^[12,38] และเมื่อสกัดด้วยเอทานอลพบว่ามีสาร brazilin อยู่ในช่วง 8.13-18.53%w/w ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอทานอลและวิธีที่ใช้ในการสกัด^[39] นอกจากนั้นเมื่อมี

การเปรียบเทียบปริมาณของ protosappanin B และ brazilin ในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสาร protosappanin B มีปริมาณน้อยกว่า brazilin โดยมีปริมาณที่ตรวจพบเท่ากับ 0.85 และ 1.52% w/w ตามลำดับ^[40] ในขณะที่เปลือกต้นมะขามป้อมมีรายงานพบ gallic acid อยู่ในช่วง 2.50-6.10% w/w^[12,41] เมื่อเปรียบจากผลการศึกษาในครั้งนี้กับรายงานที่ผ่านมาจึงทำให้เห็นได้ว่าแก่นฝางและเปลือกต้นมะขามป้อมมีความหลากหลายของปริมาณสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในยาสมุนไพรที่ประกอบด้วยพืชทั้งสองชนิดนี้

ข้อสรุป

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการต้มน้ำสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ และมีปริมาณสารองค์ประกอบหลักคือสาร protosappanin B นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่คงตัวเมื่อนำไปทดสอบความคงตัวของตัวยาคูได้สภาวะเร่งหลังจากการทดสอบที่ 180 วัน พบว่าปริมาณสาร protosappanin B ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับวันที่ 0 แต่ปริมาณสาร protosappanin B มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะเร่งที่ 120 วัน ดังนั้น สารสกัดดังกล่าวควรมีการเก็บรักษาในที่อุณหภูมิต่ำ ความชื้นต่ำ และควรเก็บรักษาในภาชนะที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดตำรับยาอาโปธาตุ อย่างไรก็ตาม การพัฒนายาตำรับดังกล่าวไปใช้ในคนไข้ควรต้องมีการทดสอบความเป็นพิษก่อนที่จะนำไปทดสอบประสิทธิผลในคนต่อไป นอกเหนือจากนั้นการจัดทำมาตรฐานของ

แก่นฝางและเปลือกต้นมะขามป้อมเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ควบคุมคุณภาพของสมุนไพรที่จะมีการศึกษาเพื่อช่วยควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและสารออกฤทธิ์ในยาสมุนไพรให้มีค่าสม่ำเสมอและทำให้ได้สมุนไพรที่มีคุณภาพเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ต่อไปได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยตามสัญญาเลขที่ กภท.10/2565 จากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

References

1. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance [Internet]. 2023. [cited 2024 May 3]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
2. Rossolini G, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*. 2014;18:56-60.
3. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE. *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultative anaerobic gram-negative bacilli from patients with intra-abdominal infections worldwide from 2005-2007: results from the SMART study. *International journal of antimicrobial agents*. 2009;34(6):585-8.
4. Sawatwong P, Sapchokul P, Whistler T, Gregory CJ, Sangwichian O, Makprasert S, Jorakate P, Srisaengchai P, Thamthitawat S, Promkong C, Nanvatthanachod P, Vanaporn M, Rhodes J. High burden of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in older adults: A seven-year study in two rural Thai provinces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2019;100(4):943-51.
5. Wongut-sa P. Extended-spectrum β -lactamases producing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from specimens of patients in Ratchaburi hospital

- (2009-2013). Region 4 Medical Journal. 2015;17(3):222-9. (in Thai)
6. Karaket C. The prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing in *K.pneumoniae* and *E.coli* at Chiang Kham hospital during 2011-2012. Phichit hospital journal. 2012;28:21-30. (in Thai)
 7. Duksukkaew S. The prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing in *K. pneumoniae* and *E. coli* at Phatthalung hospital. Region 11 Medical Journal. 2016;30(2):97-103. (in Thai)
 8. Chomjan T, Singto P. Multiple-antimicrobial resistance (AMR) of patients in internal medicine department APHEIT. Journal of Nursing and Health. 2022;4(3):1-16. (in Thai)
 9. Murray C, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. 2022;399(10325):629-55.
 10. Ayurveda Thamrong Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol university. The textbook of Thai traditional medicine. Bangkok: Supavanit printing; 2007. 309 p. (in Thai)
 11. Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. Book on the medicine of King Narai. Bangkok: The War Veterans Organization of Thailand Printing; 1999. 180 p. (in Thai)
 12. Panthong S, Sakpakdeejaroen I, Kuropakornpong P, Jaicharoensub J, Itharat A. Antibacterial activity and stability evaluation of "Apo-taat" remedy extract for inhibiting diarrhoea-causing bacteria. Tropical Journal of Natural Product Research. 2020;4(12):1101-7.
 13. Bureau of Drug and Narcotic Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia 2021. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2023
 14. Tang W, Eisenbrand G. *Caesalpinia sappan* L. In: Chinese Drugs of Plant Origin. Berlin: Springer; 1992.
 15. Zanin JLB, De Carvalho BA, Salles Martineli P, Dos Santos MH, Lago JHG, Sartorelli P, Viegas C, Soares MG. The genus *Caesalpinia* L.(Caesalpiniaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. Molecules. 2012;17(7):7887-902.
 16. Pattananandecha T, Apichai S, Julsrigival J, Ogata F, Kawasaki N, Saenjum C. Antibacterial activity against foodborne pathogens and inhibitory effect on anti-inflammatory mediators' production of brazilin-enriched extract from *Caesalpinia sappan* Linn. Plants (Basel, Switzerland). 2022;11(13):1698.
 17. Batubara I, Mitsunaga T, Ohashi H. Brazilin from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. Journal of Wood Science. 2010;56:77-81.
 18. Monroy LV, Cauch JC, Ortega AM, Campos MS. Medicinal plants as potential functional foods or resources for obtaining anticancer activity metabolites. Oncological Functional Nutrition. Cambridge: Academic Press; 2021. p. 161-94.
 19. Rajamanickam K, Yang J, Sakharkar MK. Gallic acid potentiates the antimicrobial activity of tulathromycin against two key bovine respiratory disease (BRD) causing-pathogens. Frontiers in pharmacology. 2019;9:1486.
 20. De R, Sarkar A, Ghosh P, Ganguly M, Karmakar BC, Saha DR, Halder A, Chowdhury A, Mukhopadhyay AK. Antimicrobial activity of ellagic acid against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2018;73(6):1595-603.
 21. Vu TT, Kim H, Tran VK, Vu HD, Hoang TX, Han JW, Choi YH, Jang KS, Choi GJ, Kim, JC. Antibacterial activity of tannins isolated from *Sapium baccatum* extract and use for control of tomato bacterial wilt. PloS one. 2017;12(7):e0181499.
 22. Herbal Product Division, Food and Drug Administration. Guidline of apply for herbal products permission [Internet]. 2023. [cited 2024 Jan 25]. Available from: <https://herbal.fda.moph.go.th/product/category/law-regis/>. (in Thai)
 23. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007;42(4):321-4.
 24. Kondo S, Apisanthanarak A, Trakulsomboon S, Bootkotr W, Mingmalairak C, Mahawongkajit P, Juntong J, Limpavitayaporn P, Sriussadaporn E, Tongyoo A, Boonyasatid P, Chunsirisub T, Nakornchai K, Thowprasert W, Kiratisin P, Palittapongarnpim P. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterales and distribution of blaESBL genes from patients who underwent abdominal surgery. Science & Technology Asia. 2022;27(4):104-16.
 25. European Society of clinical microbiology and infectious diseases. EUCAST clinical breakpoint tables [Internet].

- 2024 [cited 2024 Oct 19]; Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
26. ICH Harmonised Tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1(20):05.
27. International Conference on Harmonization. Q1A(R2): Stability testing of new drug substances and products [Internet]. 2003. [cited 2024 Feb 02]; Available from: <https://www.ich.org/products/guidelines.html>.
28. Srichumporn W, Chaisowwong W, Intanon M, Na-Lampang K. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pork in Muang district, Chiang Mai Province, Thailand. *Veterinary world*. 2022;15(12):2903-9.
29. Wang Z, Sun J-B, Qu W, Guan F-Q, Li L-Z, Liang J-Y. Caesappin A and B, two novel protosappanins from *Caesalpinia sappan* L. *Fitoterapia*. 2014;92:280-4.
30. O'Donnell G, Bucar F, Gibbons S. Phytochemistry and antimycobacterial activity of *Chlorophytum inornatum*. *Phytochemistry*. 2006;67(2):178-82.
31. Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*. 2019;18:241-72.
32. Zuo GY, Han ZQ, Han J, Hao XY, Tang HS, Wang GC. Antimicrobial activity and synergy of antibiotics with two biphenyl compounds, protosappanins A and B from *Sappan lignum* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015;67(10):1439-47.
33. Aires A, Fernandes C, Carvalho R, Bennett RN, Saavedra MJ, Rosa EA. Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important brassica vegetables. *Molecules*. 2011;16(8):6816-32.
34. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *EUCAST E Def*. 2000;6(9):509-15.
35. Donkor MN, Donkor AM, Mosobil R. Combination therapy: synergism among three plant extracts against selected pathogens. *BMC Research Notes*. 2023;16(1):1-5.
36. Tian Q, Wei S, Su H, Zheng S, Xu S, Liu M, Bo R, Li J. Bactericidal activity of gallic acid against multi-drug resistance *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*. 2022;173(Pt A):105824.
37. Nirmal NP, Rajput MS, Prasad RG, Ahmad M. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2015;8(6):421-30.
38. Warinhomhaun S, Sritularak B, Charnvanich D. A simple high-performance liquid chromatographic method for quantitative analysis of brazilin in *Caesalpinia sappan* L. extracts. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;42(4):208-13.
39. Insuan W, Sillawatthumrong N, Chahomchuen T, Khamchun S, Chueahongthong F, Insuan O. Brazilin content and potential biological properties of *Caesalpinia sappan* L. heartwood extracts from different extraction methods. *Discover Applied Sciences*. 2024;6:509.
40. Xia Z, Li D, Li Q, Zhang Y, Kang W. Simultaneous determination of brazilin and protosappanin B in *Caesalpinia sappan* by ionic-liquid dispersive liquid-phase micro-extraction method combined with HPLC. *Chemistry Central Journal*. 2017;11:114.
41. Chaphalkar R, Apte KG, Talekar Y, Ojha SK, Nandave M. Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. Bark extract provide hepatoprotection against ethanol-induced hepatic damage: a comparison with silymarin. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;3876040.