ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากฝาง

Antioxidant and antibacterial activities of *Caesalpinia sappan* L. Heartwood Extract

รัชกฤช ปัทมโสภาสกุล[1*] และ บุณยรัศมิ์ สุขเขียว[1]

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

[*]E-mail: ratchakrich.p@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

การใช้สมุนไพรในท้องถิ่นเพื่อรักษาโรค เป็นภูมิปัญญาของสังคมไทยมาช้านาน แต่พืชบางชนิดยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ เพื่อสร้างความมั่นใจในการใช้พืชสมุนไพร ดังนั้นเพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฝาง จึงทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดจากแก่นฝาง (*Caesalpinia sappan* L.) โดยเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง คือ ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาตรที่เหมาะสมของตัวทำละลาย น้ำหนักแก่นฝาง และระยะเวลาที่เหมาะสม หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion ผลการทดลองพบว่า ชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีการสกัดเย็นคือน้ำ ที่ร้อยละผลผลิต (3.78 ± 0.03) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการรีฟลักซ์ พบว่าปริมาตรของตัวทำละลายคือ 500 มิลลิลิตร (ร้อยละ 7.49 ± 0.10) น้ำหนักแก่นฝาง 30 กรัม (ร้อยละ7.78 ± 0.07) ที่ระยะเวลา 120 นาที (ร้อยละ 9.23 ± 0.14) วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เปรียบเทียบสารสกัดที่ได้จากการแก่นฝางที่ระยะเวลา 60, 90 และ 120 นาที พบว่า สารสกัดที่ได้จากแก่นฝางที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือสารสกัดจากแก่นฝางที่ระยะเวลาในการสกัด 90 นาที โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (DPPH) ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 5.90 ppm โดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* typhi และ *Escherichia coli* จากการเตรียมสารตัวอย่าง 2 แบบ ได้แก่ สารตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterilized) กับ สารตัวอย่างที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (unsterilized) เพื่อเป็นการทดสอบความสามารถของความเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติ (Natural Anti-microbial) ของแก่นฝาง พบว่าเตรียมสารตัวอย่างแบบ sterilized สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าการเตรียมสารตัวอย่างแบบ unsterilized เมื่อทำการเปรียบเทียบจากบริเวณใสรอบโคโรนี (clear zone) และยังพบว่าสารสกัดที่ได้จากแก่นฝางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* typhi ได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพด้วยวิธีการแพร่ผ่านกระดาษกลม (paper disc diffusion assay)

คำสำคัญ: ฝาง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

The use of traditional herbal medicine for treating illnesses has been a longstanding cultural heritage of Thai society. However, certain plant species still lack scientific data to cultivate confidence in their use as herbal remedies. Therefore, in order to verify the pharmacological efficacy of the plant

Caesalpinia sappan L. and establish its pharmacological properties, it is necessary to conduct further research. Antioxidant activity and Antibacterial activity from *Caesalpinia sappan* L., including appropriate type of solvent and volume of *Caesalpinia sappan* L. weight and a suitable time. Afterwards, the efficacy in antioxidant activity was tested using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay, as well as the efficacy in antibacterial activity paper disc diffusion assay. The results found that the suitable solvent is water with cold pressed process by yield (3.78 ± 0.03). Appropriate condition is reflux with solvent 500 mL (7.49 ± 0.10 percent), *Caesalpinia sappan* L. weight is 30 g (7.78 ± 0.07 percent) at 120 minutes (9.23 ± 0.14 percent). Antioxidant activity was analyzed by DPPH assay and antibacterial comparison of extracts obtained from *Caesalpinia sappan* L. at 60, 90 and 120 minutes, found that the extract obtained from the *Caesalpinia sappan* L. has the highest antioxidant activity is an extract from the *Caesalpinia sappan* L. at an extraction time of 90 minutes with a concentration value of the extract that can inhibit 50% of free radical (DPPH) formation (IC_{50}) value of 5.90 ppm using vitamin C as a standard substance. Study on antibacterial activity *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* were obtained from two sample preparations, which were sterilized (sterilized) and non-sterile (unsterilized) samples. Natural Anti-microbial of the *Caesalpinia sappan* L. was found that the heat stabilizer was able to inhibit bacteria better than the unsterilized sample preparation which obviously show from clear zone. It was also found that extracts obtained from the essence of *Caesalpinia sappan* L. were effective found that can inhibited *Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* showed significant effectiveness using the paper disc diffusion assay.

Keywords: *Caesalpinia sappan* Linn Antioxidant Antibacterial

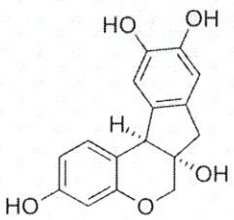
1. บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์มีความใส่ใจในเรื่องสุขภาพและความงามมากขึ้น การศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่มีผลเสียต่อร่างกายและสารที่มีประสิทธิภาพในการเสริมสร้างสุขภาพที่ดีของร่างกายจึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระและสารที่ช่วยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในร่างกาย อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก[1] เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมี ซึ่งเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆที่ล้อมรอบในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิด จนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลายชนิด[2] อนุมูลอิสระเกิดจากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์รวมทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ มลพิษ การติดเชื้อโรค รังสียูวี โอโซน (ozone) ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สามารถจับอนุมูลอิสระ และเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลตัวใหม่ได้

การศึกษาการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืช มีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในฝาง (*Caesalpinia sappan* L.) สารสกัดจากแก่นฝางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย[3] จึงมีการถูกนำมาเป็นส่วนผสมในยา และเครื่องสำอาง ประเภทครีม เจล

และ โลชั่น เพื่อใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย มีสรรพคุณทางตำรับยา คือแก่นต้มน้ำดื่มสามารถบำรุงโลหิต แก้ร้อนในกระหาย น้ำแก้ท้องร่วง แก่นฝนกับน้ำเป็นยาทาภายนอกในโรคผิวหนังบางชนิด ฆ่าเชื้อโรค ขับหนอง พืชชนิดนี้ยังสามารถหาได้ง่ายในประเทศไทยเพราะเป็นพืชเขตร้อนสำหรับประเทศไทยจะพบในพื้นที่ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าเขาหินปูนแห้งแล้ง

ฝางจัดอยู่ในวงศ์ Caesalpiniaecaea มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Caesalpinia sappan* Linn. ฝางเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของประเทศไทย จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง หรือเป็นไม้พุ่มกึ่งเถาผลัดใบ มีความสูงประมาณ 5-13 เมตร ลำต้นและกิ่งมีหนามแข็ง ดอกเป็นช่อสีเหลืองขนาดใหญ่ [4] แก่นมีสีสีแดงส้ม เนื้อไม้มีลักษณะเป็นสีส้มอ่อน พรรณไม้ชนิดนี้เป็นไม้กลางแจ้ง ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด เจริญเติบโตได้ดีในดินที่ร่วนซุย สารสำคัญของแก่นฝางสามารถพบได้ 2 กลุ่มหลัก ๆ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และสเตียรอยด์ (sterols) โดยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะมีสารประกอบหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารแทนนิน (tannin) มีสรรพคุณทางยาหลายประการ ได้แก่ แก้ท้องเสีย ยาบำรุงโลหิต ขับเสมหะ แก้ไข้ แก้ร้อนใน ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) [5] ต้านแบคทีเรีย (antibacterial) [3,5] และ ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นต้น ดังนั้นจึงได้นำฝากมาทำการพัฒนาเป็นยาสมุนไพรรักษาโรค โดยสารสกัดที่ได้จากแก่นฝางมี. สารบราซิลิน (brazilin) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งพบในปริมาณมากที่สุด เนื่องจากให้สารที่มีสีแดงจึงนิยมนำมาแต่งสีแดงในน้ำยาอุทัยทิพย์ ใช้เป็นสีผสมอาหารและผสมน้ำสำหรับดื่ม นอกจากนี้ยังนำมาผสมในเครื่องสำอาง และย้อมผ้า ด้วยคุณสมบัติและประสิทธิภาพที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้ฝางได้รับความสนใจในการนำมาใช้ประโยชน์หลาย ๆ อย่างมากมาย



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Brazilin [6]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการสกัดสารสำคัญที่ได้จากแก่นฝาง เช่น ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาตรของตัวทำละลาย น้ำหนักของแก่นฝาง และระยะเวลาในการสกัด เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงที่สุด และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากแก่นฝาง ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ด้วยวิธี DPPH assay และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial) ด้วยวิธี paper disc diffusion assay เพื่อนำข้อมูลมาใช้เพื่อพัฒนาในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป

2. วิธีการทดลอง/วิธีการวิจัย

2.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง

2.1.1 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง ด้วยวิธีสกัดเย็น

บดแก่นฝางให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก 50.00 กรัม เติมตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล และ เฮกเซน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 2 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาสเซลเซียส และคำนวณหาปริมาณผลผลิต

2.1.2 การศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง ด้วยวิธีสกัดร้อน

บดแก่นฝางให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก 50.00 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300, 400 และ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการรีฟลักซ์ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 2 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาสเซลเซียส และคำนวณหาปริมาณผลผลิต

2.1.3 การศึกษาน้ำหนักที่เหมาะสมของแก่นฝาง ด้วยวิธีสกัดร้อน

บดแก่นฝางให้ละเอียด ชั่งผงแก่นฝาง 30, 40 และ 50 กรัม ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 2 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาสเซลเซียส และคำนวณหาปริมาณผลผลิต

2.1.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง ด้วยวิธีสกัดร้อน

บดแก่นฝางให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก 50.00 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 2 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาสเซลเซียส และคำนวณหาปริมาณผลผลิต

การคำนวณหาร้อยละผลผลิตที่ได้จากสารสกัด (% yield) คำนวณจากสูตร %yield (w/w) = (น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g) x 100) / น้ำหนักของแก่นฝางที่บดแล้ว (g)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากแก่นฝางใช้วิธีกำจัดอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydracyl) ดัดแปลงมาจากวิธี sana และคณะ [7]

เตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นฝาง และสารละลายมาตรฐานวิตามินซี โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ปรับให้ได้ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 500 ppm ตามลำดับ เติมสารสกัดจากแก่นฝางลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1.60 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.40 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร(nm) ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สมการ %DPPH radical scavenging activity = [(A-B)/A] x 100 โดยให้ A เป็นค่าการดูดแสงของ DPPH (ค่าอนุมูลอิสระเริ่มต้น) และ B เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง จากนั้นทำการเขียนกราฟระหว่าง % radical scavenging เทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดจากฝาง เพื่อหาค่า IC_{50} หรือค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50

2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี paper disc diffusion ดัดแปลงวิธีมาจาก รุ่งทิพย์ กาวารี และคณะ [2]

ทำการเตรียมสารสกัดจากแก่นฝาง โดยการเตรียม 2 รูปแบบ คือ สารตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterilized) และสารตัวอย่างที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (unsterilized) มาทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) *Salmonella* typhi และ *Escherichia coli* (ได้รับการเตรียมเชื้อจากหมวดวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต) การทดสอบใช้วิธี paper disc diffusion โดยการนำเอาแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับปริมาณโดยเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (เชื้อแบคที่เรียประมาณ 1.5 X 10^8 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร)

ทำการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยการใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้นำมาเกลี่ยบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ที่เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยการป้าย และทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง หลังจากนั้นทำการระบุตำแหน่งที่ต้องการวางกระดาษกรองชุบยาปฏิชีวนะและกระดาษกรองชุบสารตัวอย่าง โดยในงานวิจัย

ใช้ Ciprofloxacin, Ampicillin, Cefoxitin และ Aztreonam เข้มข้น (10 mg/mL) เป็นPositive control และนำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ทั้งในรูปแบบ sterilized และ unsterilized (10 mg/mL) โดยนำกระดาษกรองจุ่มลงในสารละลายสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ และวางไปบนตำแหน่งที่ได้ทำการระบุได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสที่เกิดรอบอาหารเลี้ยงเชื้อ (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดสอบ 3 ครั้ง และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต และการหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง

3.1.1 ผลการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง

จากการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง ด้วยเทคนิคการใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วที่แตกต่างกัน เช่น น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธีการสกัดเย็น และทำการระเหยตัวทำละลายออก สังเกตลักษณะสี และคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิตได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัดสารจากแก่นฝางของตัวทำละลาย น้ำ, เอทานอล และ เฮกเซน

ชนิดตัวทำละลาย	ร้อยละผลผลิต ± SD		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
H_2O	3.78 ± 0.03	2.89 ± 2.36	2.48 ± 0.71
Ethanol	2.93 ± 0.55	4.23 ± 0.41	2.01 ± 0.52
Hexane	1.49 ± 0.13	0.67 ± 0.35	0.47 ± 0.01

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำสารแก่นฝางมาทำการสกัดเย็นด้วยชนิดของตัวทำละลาย และระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า ลักษณะของสารสกัดที่ได้จะให้สารของเหลวหนืดสีแดง และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิต พบว่า สารสกัดที่ได้ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ค่าร้อยละผลผลิตสูงที่สุดคือ 3.78 ± 0.03 เนื่องจากสารสำคัญที่ต้องการแก่นฝางมีความสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงกว่า ตัวทำละลายชนิดที่มีสภาพขั้วต่ำจึงทำให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น

3.1.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง ปริมาตรของตัวทำละลาย น้ำหนักของแก่นฝาง และ ระยะเวลาในการสกัด ด้วยวิธีการสกัดร้อน

ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัดสารจากแก่นฝางด้วยสภาวะที่เหมาะสม ปริมาตรของตัวทำละลาย น้ำหนักของแก่นฝาง และ ระยะเวลาในการสกัด

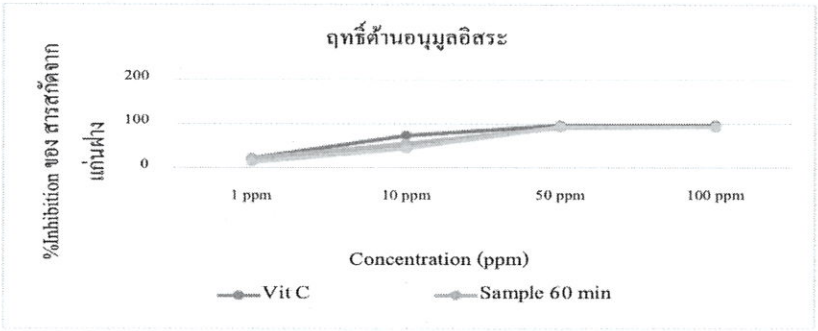
สภาวะทดสอบ	ปริมาตรของตัวทำละลาย (mL)			น้ำหนักของแก่นฝาง (g)			ระยะเวลา (min)		
	300	400	500	30	40	50	60	90	120
ร้อยละ	4.69± 0.27	5.67± 0.21	7.49± 0.10	7.78± 0.07	6.56± 0.23	6.60± 0.23	8.97± 0.24	9.13± 0.28	9.23± 0.14

จากข้อมูลตารางที่ 1 ผู้ทำวิจัยจึงได้นำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแก่นฝาง โดยทำการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลาย น้ำหนักของแก่นฝาง และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยใช้เทคนิคการสกัดร้อน (reflux extraction) จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกและสังเกตลักษณะสารสกัดหยาบ คำนวณหาค่าร้อยละผลผลิตได้ดังรางที่ 2

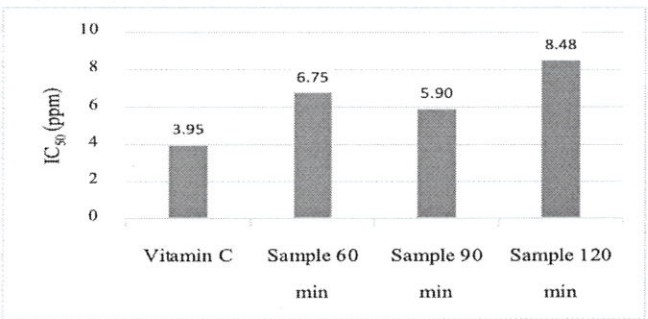
ผลของการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของของการสกัดแก่นฝาง คือ ปริมาตรของตัวทำละลาย น้ำหนักของแก่นฝาง และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด เมื่อทำการระเหยตัวทำละลายออกจะได้ของเหลวหนืดสีแดงเข้ม เมื่อนำมาคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิตพบว่า ปริมาตรของตัวทำลายที่เหมาะสมคือ 500 มิลลิลิตร ที่ร้อยละ 7.49± 0.10 น้ำหนักของแก่นฝางที่เหมาะสมคือ 30 กรัม ที่ร้อยละ 7.78± 0.07 ระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 120 นาที ที่ร้อยละ 9.23± 0.14 เนื่องจากปริมาตรของตัวทำละลาย น้ำหนักของแก่นฝาง มีผลต่อขนาดพื้นที่สัมผัสของสารตัวอย่างจึงส่งผลให้ได้ปริมาณผลผลิตที่สูงกว่าอัตราส่วนอื่นๆ และระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อการได้มาซึ่งสารสำคัญ เมื่อนำข้อมูลของระยะเวลาที่เหมาะสมมาพิจารณา พบว่าให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างกันมาก เพื่อให้ผู้นำไปใช้งานได้เกิดประโยชน์มากขึ้น จึงได้นำผลการทดลองในการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมไปทำการศึกษาต่อในด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นอีกทางเลือกให้ผู้ทำวิจัยได้นำไปใช้ประโยชน์ และเป็นทางเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากการศึกษาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยใช้สารมาตรฐานวิตามินซี และสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบคือ สารสกัดจากแก่นฝางที่ระยะเวลา 60, 90 และ 120 นาที และทำการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูล DPPH และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดกับ %Inhibition เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (DPPH) ได้ 50% (IC_{50}) ของสารสกัดจากแก่นฝาง สามารถคำนวณได้จากเส้นสมการลอการิทึม และแสดงผลดังภาพที่ 2 และทำการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารกัดที่ระยะเวลา 60, 90 และ 120 นาทีเทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซีดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบค่า %inhibition ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝางที่ระยะเวลา 60, 90 และ 120 นาที กับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบค่า IC_{50} ระหว่างสารสกัดจากแก่นฝางที่ระยะเวลา 60, 90 และ 120 นาที กับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

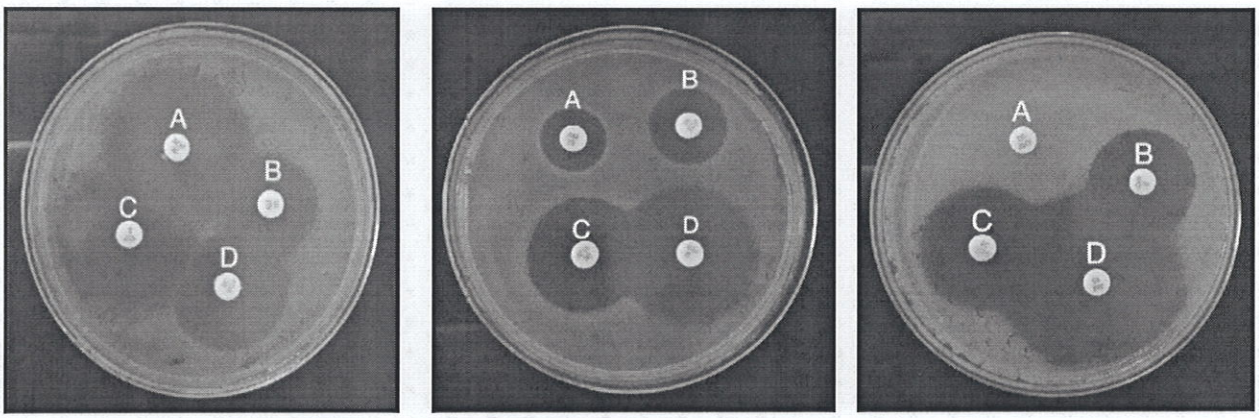
จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และใช้สารละลายวิตามินซีเป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาของ จันทนา กาญจมนต์ [8] ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝาง มีค่า IC_{50} = 35.26±2.08 ppm สารสกัดที่ได้จากแก่นฝางที่ระยะเวลาการสกัด 60, 90 และ 120 นาที มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก โดยระยะเวลาในการสกัดที่ 90 นาทีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (IC_{50} 5.90 ppm) ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีมีค่า IC_{50} 3.95 ppm จากผลงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จากแก่นฝางมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี เมื่อพิจารณาจากค่า %inhibition และค่า IC_{50} จากรูปที่ 2 และ 3

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี paper disc diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี paper disc diffusion โดยแบคทีเรียที่นำมาศึกษา ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) *Salmonella* typhi และ *Escherichia coli* ในการศึกษาใช้ยาในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Ciprofloxacin(CIP), Ampicillin (AM), Cefoxitin(FOX) และ Aztreonam(ATM) เข้มข้น 10 mg/mL เป็น Positive control และนำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ทั้งในรูปแบบผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเข้มข้น 10 mg/mL มาทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion และทำการแปลผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ใสรอบๆ บริเวณที่ใส ในหน่วยมิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 3 และลักษณะเคลียร์โซนดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5

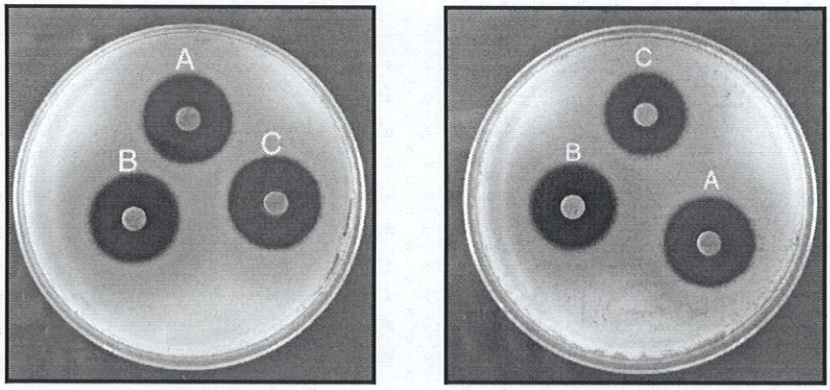
ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E.coli S.typhi S.aureus* โดยสารสกัดจากแก่นฝางแบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น (10mg/mL)

ชนิดเชื้อ	ผ่านการฆ่าเชื้อ (10mg/mL)			ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (10mg/mL)			Positive control (10mg/mL)			
	60	90	120	60	90	120	CIP	AM	FOX	ATM
E.coli	0	0	0	0	0	0	34	16	19	27
S.typhi	13	13	11	12	10	9	34	28	29	39
S.aureus	25	23	23	25	21	20	25	0	30	44



(1) (2) (3)

ภาพที่ 4 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (1) *S.typhi* (2) *E.coli* (3) *S.aureus* (A) Ampicillin (B) Cefoxitin (C) Aztreonam (D) Ciprofloxacin



(1) (2)

ภาพที่ 5 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* (1)แบบผ่านการฆ่าเชื้อ (2) ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ
(A) สารสกัดจากแก่นฝางที่เวลา 60 นาที (B) สารสกัดจากแก่นฝางที่เวลา 90 นาที
(C) สารสกัดจากแก่นฝางที่เวลา 120 นาที

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด โดยการเปรียบเทียบเทคนิคสารสกัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านฆ่าเชื้อ และสารสกัดจากแก่นฝางที่เวลา 60, 90 และ 120 นาที พบว่า การทดสอบเทคนิคโดยการนำสารสกัดไปผ่านการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการไม่นำผ่านสกัดไปผ่านการฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 3) และพบว่าสารสกัดที่ได้จากแก่นฝางที่ระยะเวลา 60 นาทีให้ผลในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.typhi* ที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.aureus* ที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร แต่ยังไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E.Coli*

4. บทสรุป

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญจากแก่นฝาง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้หาตัวทำละลาย และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากแก่นฝาง จากนั้นนำมาศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ได้จากสารสกัดสำคัญในแก่นฝาง

การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง พบว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีสุดแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วสูง จากนั้นทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแก่นฝาง พบว่าน้ำหนักแก่นฝาง 30.00 กรัม ปริมาตรตัวทำลาย 500 มิลลิลิตร เวลาในการสกัด 120 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสม ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝางที่ระยะเวลา 60, 90 และ 120 นาที ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดที่ได้จากแก่นฝางที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ สารสกัดจากแก่นฝางที่ใช้เวลาในการสกัด 90 นาที ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแก่นฝางในเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli, Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าการเตรียมสารตัวอย่างโดยผ่านการฆ่าเชื้อสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารตัวอย่างที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เวลาในการสกัดแก่นฝางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่ให้ขนาดเคลียร์โซนใหญ่ที่สุดคือ ระยะเวลาในการสกัด ที่ 60 นาที โดยขนาดเคลียร์โซนที่ได้ *S.typhi* เท่ากับ 13 มิลลิเมตร *S.aureus* เท่ากับ 25 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำวิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้ทำการสนับสนุนในเรื่องของการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณหมวดวิชาจุลชีววิทยา สำหรับการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรค และสถานที่ระหว่างการทำงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] พิชชาภรณ์ วันโย และคณะ. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะหาดด้วยวิธีDPPH radical scavenging assay. คณะเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์. 2564.

[2] รุ่งทิพย์ กาวารี และคณะ. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของฝาง. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 2560.

[3] อรวรรณ ปิยะบุญ และคณะ. ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus ของแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน. Journal of Health Science. Vol. 31 No. 6. (2556). 1132-1139.

[4] Nirmal, N.P., Rajput, M.S., Prasad, R.G.S.V. and Ahmad, M., Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review, Asian Pac.J. Trop. Biomed. 8(2015) 421-430.

[5] Batubara, I., Mitsunaga, T. and Ohashi, H., Brazilin from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent, J. Wood Sci 56. (2010) 77-81.

[6] Wu, S.Q., Otero, M., Ungena, F.M., Goldring, M.B., at.al., Anti-inflammatory activity of an ethanolic *Caesalpinia sappan* extract in human chondrocytes and macrophages, J. Ethnopharmacol. 138. (2011)364-372.

[7] YAN, Y, CHEN, Y, LIN, Y et,al. Brazilin isolated from the heartwood of Caesalpinia sappan L induces endothelium-dependent and - Independent relaxation of rat aortic rings. Acta Pharmacologica Sinica. (2015)

[8] Sana, H., Sabitha Rani, A. and Sulakshana, G., Determination of antioxidant potential in Spilanthes acmella using DPPH assay, Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3(2014)219-223).

[9] จันทนา กาญจน์กมล. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดฝาง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ววท.). vol.29 No.2. (2021). 307-317.