การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของแก่นฝางแดง

Evaluation of Antioxidant Activity from Heartwoods of *Caesalpinia sappan* L.

ทิมพิกา พรพรม[1] ภาพตะวัน ทองดี[1] บงกชวรรณ พาคำวงค์[1] นฤดล ภูศรี[1] สมจินตนา ทวีพานิชย์[1]
กัมปนาท ฉายจำรัส[1] สายสมร ลำลอง[1] ประจักกิจ ระวี[1] จิตรลดา เดชาติวงศ์[1] จิดาภา แสงสวันต์[2]
กาญจนา แปงจิตต์[3] พฤทธิ์ คำศรี[4] อรดี พันธ์กว้าง[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5] ประสาท กิตตะคุปต์[6,7,8]
และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1*]

Thimpika Pornprom[1], Paptawan Thongdee[1], Bongkotchawan Pakamwong[1], Naruedon Phusi[1], Somjintana Taveepanich[1]
Kampanart Chayajarus[1], Saisamorn Lumlong[1], Prajakkit Rawee[1], Jitlada Dechatiwong[1], Jidapa sangswan[2],
Kanjana Pangjit[3], Pharit Kamsri[4], Auradee Punkvang[4], Khomson Suttisintong[5], Prasat Kittakoop[6,7,8]
and Pornpan Pungpo[1*]

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]ภาควิชาชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[3]วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[4]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[5]ศูนย์นาโนเทคโนโลยี อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
[6]สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
[7]สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์
[8]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมและพิษวิทยา
[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University
[2]Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University
[3]College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University
[4]Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University
[5]National Nanotechnology Center, NSTDA, Thailand Science Park
[6]Chulabhorn Research Institute
[7]Chulabhorn Graduate Institute, Chemical Biology Program, Chulabhorn Royal Academy
[8]Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology (EHT), OPS, Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation
[*]E-mail: pronpan_ubu@yahoo.com

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันฝางแดงได้รับการศึกษาเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างแพร่หลาย โดยฝางแดงเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาหลายประการ และมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้วยคุณสมบัติและศักยภาพดังกล่าวจึงทำให้ฝางแดงได้รับความสนใจในการใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย และพบว่าสารสกัดฝางแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อหาสารสกัดจากสมุนไพรไทยาประยุกต์ในการรักษาโรค โดยในงานวิจัยนี้ได้นำฝางแดงมาศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งวิธีการศึกษาผู้วิจัยได้นำแก่นฝางแดงสกัดแบบแช่หมักด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่ วิธี DPPH ABTS และ FRAP ทั้งสามวิธีให้ผลสอดคล้องกัน คือ สารสกัดหยาบเมทานอลของแก่นฝางแดง ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 86.90 ± 0.53, 93.95 ± 0.05

เปอร์เซ็นต์ และ 618.52 ± 0.05 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้งตามลำดับ จากผลการศึกษานี้สามารถนำสารสกัดหยาบไปแยกบริสุทธิ์เพื่อศึกษาสารสำคัญเพื่อเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยและพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

คำสำคัญ: แก่นฝางแดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดหยาบ

Abstract

In currently, *Caesalpinia sappan L.* has been widely studied for its bioactivity. *Caesalpinia sappan L.* is a native medicinal plant of Thailand which has many medicinal properties. There are reports of biological activities, including antioxidant activity, antibacterial effect, anti-cancer effect and anti-inflammatory effect with such properties and potential. Heartwoods of *Caesalpinia sappan L.* has been interested in many uses. *Caesalpinia sappan L.* were report that has antioxidant activity. Therefore, this research was studied the antioxidant in order to find natural extracts to apply in the treatment of diseases. The antioxidant efficacy studied by using DPPH assay, ABTS assay, and FRAP assay. The results show that in three methods is the crude methanol extract of heartwoods of *Caesalpinia sappan L.* has the highest antioxidant activity at the value of 86.90±0.53%, 93.95±0.05% and 618.52±0.05 mg ascorbic acid/g respectively. In addition, this study crude extracts of Thai herbs can be isolated and purified to useful to further study and develop it as a therapeutic drug.

Keywords: Heartwoods of *Caesalpinia sappan* L., Antioxidant, Crude Extract

บทนำ

ฝางแดงจัดอยู่ในวงศ์ Caesalpiniaecaea มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Caesalpinia sappan L.* ชื่อสามัญ คือ Sappan ฝางแดงเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของประเทศไทย มีลักษณะเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 5-8 เมตร มีหนามแข็งทั่วทั้งลำต้น ใบมีลักษณะเหมือนใบมะขาม ดอกเป็นช่อ มีสีเหลืองขนาดใหญ่ เนื้อไม้เป็นสีส้มอ่อน แก่นมีสีแดงออกส้มเข้ม ซึ่งมีสรรพคุณทางยาหลายประการ ได้แก่ แก้ท้องเสีย เป็นยาบำรุงโลหิต ขับเสมหะ ขับระดู แก้ไข้ แก้ร้อนใน แก้กระหายน้ำ ป้องกันโรคหืด (จันทนา, 2020) และมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Antibacterial) ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Anticancer) (Nirmal, N.P et al., 2014; 2015; Rajput, M.S et al, 2021; ชนัญ และศรัณยู, 2019; Hemalatha, K et al, 2008) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) (Min, B.S et al, 2012) มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของแก่นฝางแดง ได้แก่ กลุ่มฟีนอลิก (Phenolic) แซนโทน (Xanthone) คูมาริน (Coumarin) ชาลโคน (Chalcones) ฟลาโวน (Flavones) โฮโมไอโซฟลาโวนอยด์ (Homo-isoflavonoids) และบราซิลิน (Brazilin) (Nirmal, N.P et al, 2015; Ji, Y. et al, 2019) โดยสารสกัดที่ได้จากแก่นฝางแดงมีสารบราซิลินเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งพบในปริมาณมากที่สุด เนื่องจากให้สีแดงจึงนำมาแต่งสีแดงของน้ำยาอุทัย ใช้เป็นสีปรุงอาหารหรือแต่งสีขนมหวานที่ให้ความปลอดภัย ด้วยสมบัติและศักยภาพดังกล่าวจึงทำให้ฝางแดงได้รับความสนใจในการใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย จากการมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากฝางแดงพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ผลดี ซึ่งสารอนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว และไม่เสถียรจึงพยายามหาอิเล็กตรอนจากสารชีวโมเลกุลอื่นมาจับคู่เพื่อความเสถียรทำให้เกิดความว่องไว ในการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ มีผลทำให้คุณสมบัติการทำงานของ

สารชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดการบกพร่องหรือเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่น โรคมะเร็ง ภาวะความแก่ชรา โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคธาลัสซีเมีย (ศรมน, 1986) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อหาสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ในการรักษาโรคธาลัสซีเมียหรือโรคโลหิตจาง โรคโลหิตจางเป็นโรคพันธุกรรมที่มีการสร้างโปรตีนโกลบินชนิดใดชนิดหนึ่งน้อยกว่าปกติ จึงทำให้เกิดการเสียสมดุล เนื่องจากในสภาวะที่มีความผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบของเซลล์ที่อยู่ภายในร่างกาย และเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายได้ รวมทั้งอาจทำให้เกิดโรคในระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารประกอบธรรมชาติหลายชนิดในพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประเภทฟลาโวนอยด์ เคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoid) เควอซิติน (Quercetin) เป็นต้น สารเหล่านี้มี คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าวิตามินอี ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาผลของการให้สารธรรมชาติเหล่านี้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (อิศรางค์, 1974) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสมุนไพรแก่นฝางแดงที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นหายาก และยังไม่มีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรนี้มากนัก เพื่อนำไปพัฒนาศึกษาความสามารถในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมวัสดุสมุนไพรแก่นฝางแดง

นำแก่นฝางแดงมาสับเป็นชิ้นเล็กจากนั้นนำแก่นฝางแดงมาบดให้มีขนาดเล็ก (ประมาณ 1-2 เซนติเมตร) ด้วยเครื่องบดสมุนไพร ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) แสดงดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 แก่นฝางแดงบดละเอียด

ชั่งตัวอย่างแก่นฝางแดงที่บด 8.9 กิโลกรัมและนำมาห่อด้วยผ้าขาวบางใส่ลงในโหล สกัดด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ตามลำดับ ปริมาตร 35 ลิตร นำฟอยล์มาหุ้มและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน นำมากรองด้วยผ้าขาวบางและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ระเหยตัวทำละลายในตู้ดูดควัน บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนและหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การเตรียมสารทดสอบ สารมาตรฐาน และสารตัวอย่าง

การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 6.0 x 10^{-5} โมลาร์ ชั่ง DPPH 0.0024 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (Analytical grade) ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) เก็บไว้ในที่มืดไม่ให้โดนแสง โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้ การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Trolox®) เข้มข้น (Stock standard solution) ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่ง Trolox® 0.0100 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสง โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้ การเตรียมสารมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ (Working standard solution) ของ Trolox® ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร การเตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่งสารสกัดหยาบชนิดละ 1.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล

ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (Microcentrifuge tube) เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้ม

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยใช้วิธี DPPH

ปิเปตสารละลาย DPPH 6x10-5 โมลาร์ ปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Trolox® หรือสารตัวอย่างปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารละลาย DPPH 6x10-5 โมลาร์ ปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และจากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม (Control) ปิเปตเมทานอล ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวทท์ (Cuvette) ชนิด quartz เพื่อใช้ เป็น blank วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-Visible spectroscopy จากนั้นนำสารละลายที่ครบ 1 ชั่วโมง แล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox® ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Trolox® กับค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) จะได้กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด จากสูตร

$$\%\text{DPPH Radical Scavenging Activity} = \left(\frac{A_{control} - A_{sample}/A_{Std}}{A_{control}}\right) \times 100$$

โดยที่

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{std} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากแก่นฝางแดง

วัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ได้หา ค่าเฉลี่ยเพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบสมุนไพร (แกน y) กับ ชนิดของวิธีการสกัด (แกน x)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยใช้วิธี ABTS

ปิเปต ABTS ปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Trolox® หรือสารตัวอย่าง ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปิเปต ABTS ปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม ปิเปตเมทานอล ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ใส่ใน Cuvette เพื่อใช้เป็น blank วัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy นำสารละลายที่ครบ 20 นาที แล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสง สร้างกราฟมาตรฐานของ Trotox® ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Trolox® กับค่าการดูดกลืนแสงจะได้กราฟมาตรฐาน คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากตัวอย่างสารสกัด จากสูตร

$$\%\text{ ABTS Cation Radical Scavenging Activity} = \left(\frac{A_{control} - A_{sample}/A_{Std}}{A_{control}}\right) \times 100$$

โดยที่

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS

A_{std} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบสมุนไพร

วัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ได้หา ค่าเฉลี่ยเพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง ABTS ของสารสกัดหยาบสมุนไพร (แกน y) กับ ชนิดของวิธีการสกัด (แกน x)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยใช้วิธี FRAP

ปิเปตตัวอย่าง และ สารมาตรฐาน (L-ascorbic acid) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม working FRAP reagent ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำ DI ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ใส่ใน cuvette เพื่อใช้เป็น blank วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-visible spectroscopy สร้างกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ความเข้มข้น 50, 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของ L-ascorbic acid กับค่าการดูดกลืนแสงจะได้กราฟมาตรฐาน การคำนวณ โดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานคำนวณจากสูตร $y = mx + C$ แทน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบเมทานอลของสารตัวอย่างแต่ละชนิด m คือ ค่าความชัน และ c คือ ค่าจุดตัดแกน y เมื่อแทนค่าในสมการจะได้ค่า x ซึ่งก็คือค่า FRAP value วัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง คำนวณหาค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในรูป FRAP value แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในรูป FRAP value ของสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด (แกน y) กับ ชนิดของวิธีการสกัด (แกน x)

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดตัวอย่าง

ผลการสกัดแก่นฝางแดงด้วยตัวทำละลาย โดยใช้วิธีการสกัดแบบแช่หมัก

นำตัวอย่างแก่นฝางแดงที่แห้ง และบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ใช้อัตราส่วนตัวอย่างแก่นฝางแดง 8.9 กิโลกรัม ต่อตัวทำละลาย 35 ลิตร ใช้อัตราส่วนตัวอย่างแก่นฝางแดง 8.9 กิโลกรัม ต่อตัวทำละลาย 35 ลิตรโดยทำการสกัดแบบแช่หมักและระเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทานอลด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย จะได้สารสกัดของตัวอย่างแก่นฝางแดง ซึ่งจะได้น้ำหนักและผลผลิตร้อยละของสารสกัดแก่นฝางแดงดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน เมทานอลและผลผลิตร้อยละของแก่นฝางแดง

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง ที่ใช้ในการสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	% yield
ไดคลอโรมีเทน	8,900	16.56	0.19
เมทานอล	5,000	444.57	8.90

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบโดยใช้วิธี DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดงของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทานอล โดยเทียบกราฟมาตรฐานของ Trolox® ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร จากคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดงพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดตามด้วยไดคลอโรมีเทน มีค่าเท่ากับ 86.90 ± 0.53 และ 63.49 ± 14.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 1

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสมุนไพร โดยใช้วิธี ABTS

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้แก่ สารสกัดหยาบแก่นฝางแดงของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทานอล โดยใช้วิธี ABTS โดยเทียบกราฟมาตรฐานของ Trolox® ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ตามด้วยไดคลอโรมีเทน มีค่าเท่ากับ 93.95 ± 0.05 และ 81.76 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดง เห็นได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลมีต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox® ซึ่งมีค่าเท่ากับ 95.55 ± เปอร์เซ็นต์ 0.01 แสดงดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 2

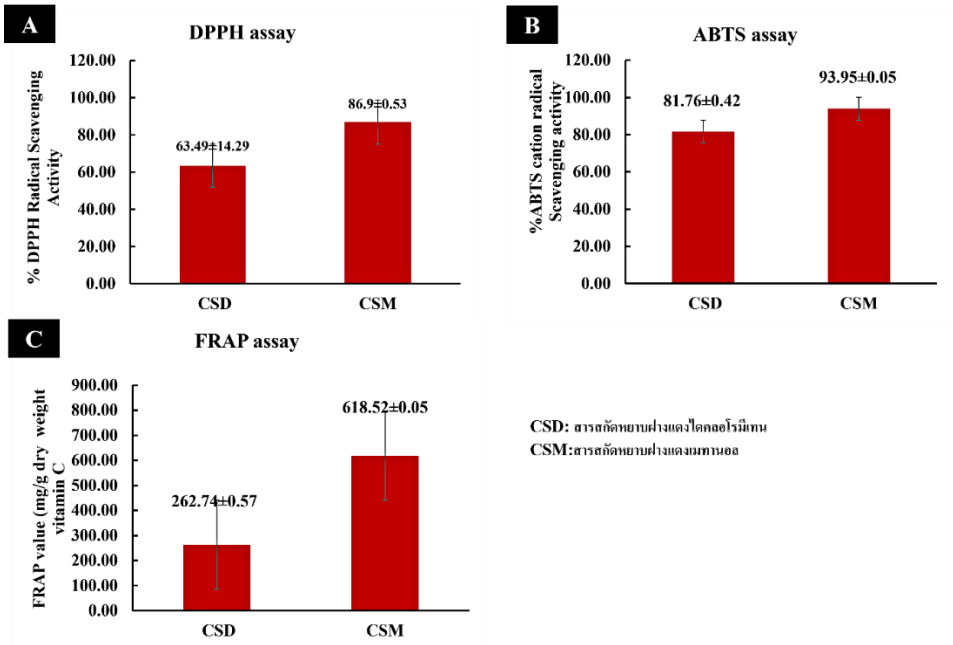
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ โดยใช้วิธี FRAP

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ได้แก่ สารสกัดหยาบแก่นฝางแดงของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

และเมทานอล โดยใช้วิธี FRAP โดยเทียบกราฟ มาตรฐานของ L-ascorbic ความเข้มข้น 50, 100, 250, 500 และ 1000 ไมโครโมลาร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสง คำนวณปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดง เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดโดยวิธี FRAP ในส่วนของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดงพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ตามด้วยไดคลอโรมีเทน มีค่าเท่ากับ 618.52 ± 0.05 และ 262.74 ± 0.57 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดง เห็นได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1450 ± 0.10 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของสารสกัด แสดงดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดง

ตัวทำละลาย	ร้อยละการฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		
	วิธี DPPH (%DPPH ± SD)	วิธี ABTS (%ABTS ± SD)	วิธี FRAP (%ABTS ± SD)
ไดคลอโรมีเทน	63.49 ± 14.29	81.76 ± 0.42	262.74 ± 0.57
เมทานอล	86.90 ± 0.53	93.95 ± 0.05	618.52 ± 0.05
สารมาตรฐาน	93.55 ± 0.08	95.55 ± 0.01	1450 ± 0.10



ภาพที่ 2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแก่นฝางแดง

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เมทานอลของแก่นฝางแดงพบว่า ผลผลิตร้อยละของแก่นฝางแดงแช่หมักในเมทานอลให้ค่าผลผลิตร้อยละเท่ากับ 8.90 เมื่อเปรียบเทียบกับแก่นฝางแดงแช่หมักในไดคลอโรมีเทนที่มีผลผลิตร้อยละเท่ากับ 0.19 จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพบว่า ด้วยวิธี DPPH ABTS พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลของแก่นฝางแดงมีการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับรายงานของ (ไอลดาและสุปรานี, 2020) มีความสอดคล้องกันว่าสารสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าตัวทำละลายอื่น เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง จึงทำให้สารสกัดหยาบแก่นฝางแดงมีความสามารถในการละลายสาระสำคัญเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกที่มีขั้วสูง ซึ่งทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน เพราะมีกลไกปฏิกิริยาในการจับกับอนุมูลอิสระที่เหมือนกัน จากผลการทดลองความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ด้วยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี เมื่อเทียบกับรายงานของ (Abdul Ameer A. Allaith, 2014) มีความสอดคล้องกันว่าสารสกัดจากเมทานอลมีความสามารถในการเป็นเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี กว่าตัวทำละลายอื่น จึงทำให้สารสกัดหยาบแก่นฝางแดง มีความสามารถในการละลายสารสำคัญที่มีขั้วสูง เช่นกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์กับอนุมูลอิสระที่ดี

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน และเมทานอลของแก่นฝางแดงพบว่า สารสกัดหยาบที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยสารสกัดหยาบเมทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า 86.90 ± 0.53 และ 93.95 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน มีค่า 63.49 ± 14.29 และ 81.76 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์โดยวิธี FRAP ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบให้ผลที่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ซึ่งให้ค่า FRAP value ของสารสกัดหยาบเมทานอลและไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 618.52±0.05 และ 262.74 ± 0.57 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากการศึกษาผลผลิตร้อยละพบว่า สารสกัดหยาบจากเมทานอลให้ค่าผลผลิตร้อยละดีที่สุด คือ 8.90 และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าวิธีการสกัดแบบแช่หมักด้วย

ตัวทำละลายพบว่า สารสกัดหยาบจากเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นและสามารถนำความรู้ที่ได้ไป ต่อยอดนำสารสกัดหยาบทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{1}H NMR และ ^{13}C NMR spectroscopy) และเพื่อนำไปพัฒนาศึกษาฤทธิ์การจับเหล็กและพัฒนาเป็นยารักษาโรคธาลัสซีเมียต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (Royal Golden Jubilee PhD. Program) (NRCT5-RGJ63020-165) ที่ได้สนับสนุนเงินทุนแก่ นางสาวฑิมพิกา พรพรม และส่งเสริมให้เกิดความร่วมมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) เพื่อสนับสนุนงานวิจัยมูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ 2566 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนตลอดการทำวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านห้องปฏิบัติการเคมี เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ สารเคมี และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

จันทนา กาญจน์กมล. (2020). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดฝาง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *29*(2), 307-317.

ชนัญ ผลประไพ และศรัณยู อุ่นทวี. (2019). การพัฒนากระบวนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *8*(5), 479-492.

ศรมน สุทิน, พัชรี ภคกษมา, กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ, ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ และนพวัฒน์ เพ็งคำศรี. (1986). คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ*, *5*(1), 30-40.

อิศรางค์ นุชประยูร. (1974). อนุมูลอิระและโรคโลหิตจางธาลัสเมีย. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*, *14*(2), 84-89.

ไอลดา แกนุ และ สุปรานี กองคา. (2020) ผลของการสกัดด้วยเอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแก่นฝาง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *10*(1), 96-108.

Allaith, A. A. A. (2016). Assessment of the antioxidant properties of the caper fruit (*Capparis spinosa* L.) from Bahrain. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, *19*, 1-7.

Ji, Y., Zhang, Y. Q., Liu, T. D., Xia, M. Y., Long, C. L. and Wang, L. (2019). Chemical constituents from heartwoods of *Caesalpinia sappan* with antiplatelet aggregation activities. *Chinese Herbal Medicines*, *11*(4), 423-428.

Min, B. S., Cuong, T. D., Hung, T. M., Min, B. K., Shin, B. S. and Woo, M. H. (2012). Compounds from the heartwood of *Caesalpinia sappan* and their anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *22*(24), 7436-7439.

Nirmal, N. P. and Panichayupakaranant, P. (2014). Anti-Propionibacterium acnes assay-guided purification of brazilin and preparation of brazilin rich extract from *Caesalpinia sappan* heartwood. *Pharmaceutical Biology*, *52*(9), 1204-1207.

Nirmal, N. P. and Panichayupakaranant, P. (2015). Antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities of standardized brazilin-*rich Caesalpinia sappan* extract. *Pharmaceutical Biology*, *53*(9), 1339-1343.

Rajput, M. S., Nirmal, N. P., Nirmal, S. J., Santivarangkna, C. (2021) Bio-actives from *Caesalpinia sappan* Linn: Recent advancements in phytochemistry and pharmacology. *South African Journal of Botany*, 151, 60-74.