ผลของการสกัดด้วยเอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแก่นฝาง

Effect of Ethanolic Extraction and Partial Purification on Phenolic Compounds Content and Antioxidant Capacities of *Caesalpinia sappan* Heartwood

ไอลดา แกนุ* และ สุปรานี กองคำ

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Aylada Kaenu* and Supranee Kongkham

Faculty of medicine, Thammasat University, Rangsit Centre

Received: August 7, 2020; Accepted: September 11, 2020

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของเอทานอลที่ใช้ในการสกัดแก่นฝางต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสกัดแก่นฝางด้วย 95%, 75% และ 50% เอทานอล และสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วยน้ำ ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท นำสารสกัดที่ได้ไปวัดประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทางเคมี นอกจากนี้ยังหาปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิกรวมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝางขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้สกัดและการสกัดสารให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า การสกัดด้วย 75% เอทานอลให้สารสกัดที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยที่สารสกัดหยาบที่สกัดด้วย 75% เอทานอลนั้นมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ $ABTS^{\cdot+}$ (ค่า IC_{50} ต่ำ) และสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในหลอดทดลอง (14.21±0.47 μg/mL) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ (p-value$<$0.01)

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ฝาง; สารสกัดด้วยเอทานอล; การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

Abstract

The effect of different ethanol concentrations and partial purification, used for the extraction of *C. sappan* heartwood, on the antioxidant capacity was investigated. The heartwood of *C. sappan*

**Corresponding author: aylada79@gmail.com*

DOI: 10.14456/tjst.2021.8

was extracted with 95%, 75%, and 50% ethanol and subsequently partitioned using deionized water, dichloromethane, and ethyl acetate. The fractions were subjected to different antioxidant assays based on free radical scavenging activity (DPPH and ABTS•+ assay) and lipid peroxidation assay (TBARS assay). Additionally, the content of total phenols and flavonoids was determined. The present study provides evidence that the total phenolic content and antioxidant capacity of *C. sappan* heartwood extracts were significantly dependent on the ethanol concentration used for extraction. However, the subsequent ethyl acetate fraction showed the overall strongest anti-oxidative activity in the chemical-based assays. In the present study, the crude extract prepared using 75% ethanol is the best of antioxidant properties. This extract contains a considerable amount of total phenols, with inhibited DPPH and ABTS•+ free radical (low IC_{50} values) and inhibited lipid peroxidation *in vitro* (14.21±0.47 μg/mL). Also, total phenolic content and antioxidant capacity were closely correlated (p-value <0.01).

Keywords: Antioxidant activity; *Caesalpinia sappan* L.; Ethanolic extraction; Partial purification.

1. บทนำ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น หรือทำให้ปฏิกิริยาเกิดช้าลง ในสภาวะที่เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน อันเกิดจากการที่มีความไม่สมดุลของสารอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ที่มากเกิน ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น การทำลายของดีเอ็นเอ การทำลายของโปรตีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในไขมันไม่อิ่มตัว เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยเฉพาะไขมันซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดเฉพาะผนังเซลล์เท่านั้น แต่จะส่งผลต่อองค์ประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ และทำให้เกิดการตายของเซลล์ทั้งแบบเนโครซิส และอะพอพโทซิส ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อส่งผลต่อความเสื่อม หรือการแก่ของเซลล์ในระยะยาวและก่อให้เกิดพยาธิสภาพในอวัยวะต่าง ๆ มีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่าอนุมูลอิสระนี้มีความเกี่ยวข้อง กับโรคหลายชนิด ได้แก่ เบาหวาน โรคหลอดเลือดแดงแข็ง โรคความเสื่อมในระบบประสาท โรคหัวใจ และ มะเร็ง เป็นต้น (Potterat, 1997) ซึ่งโดยปกติแล้วร่างกายมีระบบต้านอนุมูลอิสระที่สามารถจัดการกับอนุมูลอิสระได้ แต่หากร่างกายได้สารที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป (Utarwuthipong *et al.*, 2009) หรืออยู่ในภาวะที่ระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง เช่น ในผู้สูงอายุจะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจ มะเร็ง โรคความจำเสื่อม เป็นต้น

ฝาง เป็นสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ถั่ว (Fabaceae หรือ LEGUMINOSAE) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Caesalpinia Sappan* Linn ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งพบได้ในเขตร้อน เช่น อินเดีย ศรีลังกา พม่า กัมพูชา ลาว เวียดนาม และจีนตอนใต้ สำหรับประเทศไทยมักพบในพื้นที่ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าเขาหินปูนแห้งแล้ง ส่วนที่ใช้คือแก่นฝาง ซึ่งมีสีส้มแดง ให้รสฝาดขม และมีการนำมาใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านของไทย เช่น ช่วยรักษาวัณโรค

ท้องเสีย โรคบิด การติดเชื้อของระบบผิวหนัง และโรคโลหิตจาง (Sireeratawong *et al.*, 2010) เป็นต้น สารเคมีที่ได้จากแก่นฝาง เป็นสารในกลุ่มของฟีนอลิครวมทั้ง แซนด์โธน คูมาริน ชาลโคน ฟลาโวน โฮโมไอโซฟลาโวนอยด์ บราซิลีน และอื่น ๆ (Nirmal, Rajput*, et al.*, 2015) ซึ่งบราซิลีนจัดเป็นสารประกอบที่พบมากในแก่นฝาง การศึกษาของการแพทย์แผนจีนมีรายงานว่าแก่นฝางช่วยเพิ่มการหมุนเวียนของเลือด การต้านการอักเสบ และลดอาการปวดประจำเดือน (Nirmal, Rajput*, et al.*, 2015) นอกจากนี้มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Xu *et al.*, 2004), ต้านการอักเสบ (Washiyama *et al.*, 2009), ชะลอวัย (Lee *et al.*, 2012), ลดน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน (You *et al.*, 2005), ช่วยในการคลายตัวของหลอดเลือด (Hu *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2000), ป้องกันการเกิดภาวะภูมิแพ้ (Yodsaoue *et al.*, 2009), ลดการเกิดสิว (Nirmal *et al.*, 2014; Batubara, 2009), เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีเอส (Sasaki *et al.*, 2007), ต้านอนุมูลอิสระ (Nirmal and Panichayupakaranant, 2015; Nirmal, Rajput*, et al.*, 2015; Yun *et al.*, 2006), และช่วยลดความเป็นพิษในเซลล์ตับ (Xu *et al.*, 2004) สำหรับวิธีการสกัดแก่นฝางส่วนใหญ่สกัดด้วย 95% เอทานอล (Nirmal *et al.*, 2014; Warinhomhaun *et al.*, 2018) และมีการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อให้ได้สารหลักที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งขึ้นกับวิธีการสกัดสาร เช่น การสกัดด้วยตัวทำลายที่มีความมีขั้วมากขึ้น (ละลายน้ำมากขึ้น) จากการศึกษาก่อนหน้าของ Warinhomhuan และคณะ (Warinhomhaun *et al.*, 2016) พบว่าการสกัดด้วย 95% เอทานอลและนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ดังนั้นจุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาวิธีการสกัดแก่นฝางโดยใช้สารละลายที่มีคุณสมบัติที่มีขั้วมากขึ้นในขั้นตอนการสกัดและนำมาสกัดด้วยวิธีการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์คุณสมบัติฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทางเคมี

2. วิธีการ

2.1 การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการแยกชั้นของสาร

นำแก่นฝางไปอบให้แห้งและบดเป็นผง จากนั้นนำไปแช่สกัดด้วยเอทานอลที่เปอร์เซ็นต์ต่างกัน (95%, 75% และ 50% เอทานอล) ระเหยเอทานอลออก ได้เป็นสารสกัดหยาบ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย น้ำ ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท ดังนี้

ผสมน้ำกลั่นกับสารสกัดหยาบ
150 มิลลิลิตร : 0.25 กรัม
↓ คน 18 ชั่วโมง
เติมไดคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตร
↓ คน 1 ชั่วโมง
แยกชั้นไดคลอโรมีเทนออกมาโดย
วางทิ้งไว้ให้แยกชั้นด้วย Separatory funnel
↓
เติมเอทิลอะซิเตท 50 มิลลิลิตร (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
↓ คน 1 ชั่วโมง
แยกชั้นเอทิลอะซิเตทออกมาโดย
วางทิ้งไว้ให้แยกชั้นด้วย Separatory funnel
↓
ได้ส่วนชั้นน้ำ
↓
นำทุกชั้นที่ได้ไประเหยและทำแห้งด้วยการใช้ความเย็น (Freeze dry)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝาง

2.2.1 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (DPPH scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Re และคณะ (Re et al., 1999) โดยเตรียมสารสกัดจากแก่นฝางที่ความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน 96 well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น $6x10^{-5}$ โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้ BHT เป็นตัวควบคุมบวก ทำการคำนวณหาค่า %DPPH radical scavenging ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH radical scavenging (แกน Y) กับความเข้มข้นของสารสกัด (แกน X) เพื่อหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารที่สามารถลดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50)

$$\%inhibition = A_{ควบคุม} - A_{สารสกัด} / A_{ควบคุม} \times 100$$

2.2.2 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ (ABTS scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Huang และคณะ (Huang et al., 2005) โดยเตรียมสารสกัดจากแก่นฝางที่ความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาตร 980 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลืนแสง โดยใช้ BHT เป็นตัวควบคุมบวก ทำการคำนวณหาค่า %ABTS radical scavenging และรายงานผลเป็นค่า IC_{50}

$$\%inhibition = A_{ควบคุม} - A_{สารสกัด} / A_{ควบคุม} \times 100$$

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นของไขมัน (In vitro anti-lipid peroxidation)

การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นของไขมัน ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ohkawa และคณะ (Ohkawa et al., 1979) โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง 180 ไมโครลิตร เติมไขมันอิมัลชัน ยี่ห้อ intralipid® ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ ฟีนิลไฮดราซีน ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมล/ลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นเติมกรดไธโอบาบิทูริก ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 45 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลืนแสง โดยใช้ BHT เป็นตัวควบคุมบวก ทำการคำนวณหาค่า % inhibition และรายงานผลเป็นค่า IC_{50}

$$\%inhibition = A_{ควบคุม} - A_{สารสกัด} / A_{ควบคุม} \times 100$$

2.3 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

การทดสอบหาปริมาณารประกอบฟีนอลิกรวม ดัดแปลงมาจากวิธีของ Velioglu และคณะ (Velioglu *et al.*, 1998) โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง เติม Folin-Ciocaltue reagent ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 525 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 525 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 725 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ของกรดแกลลิก รายงานผลเป็นหน่วย mg GAE/g *Caesalpinia sappan* extract

2.4 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content)

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ดัดแปลงมาจากวิธีของ Zhu และคณะ (Zhu et al., 2010) โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม โซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 5% (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร และอะลูมิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10% (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่ม 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเทชิน รายงานผลเป็นหน่วย mg CE/g *Caesalpinia sappan* extract

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝาง โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product-moment correlation coefficient) การแปลผลค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบ่งเป็น 5 ระดับ (Hinkle et al., 1998) ดังนี้

ค่าความสัมพันธ์ (r)	การแปรผล
0.90-1.0	มีความสัมพันธ์ในระดับสูงมาก
0.70-0.90	มีความสัมพันธ์ในระดับสูง
0.50-0.70	มีความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง
0.30-0.50	มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ
0.00-0.30	มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำมาก

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝาง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range test และการหาความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝางโดยวิธี Pearson ด้วยโปรแกรม SPSS version 13.0 for windows

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 วิเคราะห์ปริมาณสารสกัดจากแก่นฝาง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดแก่นฝางด้วยเปอร์เซ็นต์เอทานอลที่ต่างกัน คือ 95%, 75% และ 50% ได้สารสกัดหยาบ 3 ตัวอย่าง และนำสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตท น้ำ และไดคลอโรมีเทน ได้สารสกัดจากขั้นตอนนี้ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง โดยในส่วนของการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยไดคลอโรมีเทนไม่ได้นำมาศึกษาวิเคราะห์ ดังนั้นตัวอย่างสารสกัดจากแก่นฝางในการศึกษาครั้งนี้จึงประกอบด้วย 9 ตัวอย่าง โดยจะใช้อักษรย่อของสารตัวอย่างที่ได้ตาม Table 1

จากการศึกษาปริมาณสารสกัดจากแก่นฝางเมื่อนำไปประเหยแห้ง พบว่าสารสกัด 75C ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดคือ 12.14% รองลงมาคือสารสกัด 50C และ 95C ได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 11.62% และ 10.06% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนชั้นอื่น ๆ มีปริมาณสารสกัดรองลงมา ดังที่แสดงใน Table 2

Table 1 Abbreviations for sample extracts

Extracts (initials)	Extraction and partial purification extracts
1. 95% Crude (95C)	Crude extract with 95% ethanol
2. 95% Ethyl acetate (95E)	Crude extract with 95% ethanol and partial purification with ethyl acetate
3. 95% Water (95W)	Crude extract with 95% ethanol and partial purification with water
4. 75% Crude (75C)	Crude extract with 75% ethanol
5. 75% Ethyl acetate (75E)	Crude extract with 75% ethanol and partial purification with ethyl acetate
6. 75% Water (75W)	Crude extract with 75% ethanol and partial purification with water
7. 50% Crude (50C)	Crude extract with 50% ethanol
8. 50% Ethyl acetate (50E)	Crude extract with 50% ethanol and partial purification with ethyl acetate
9. 50% Water (50W)	Crude extract with 50% ethanol and partial purification with water

3.2 ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH และ ABTS$^{\cdot+}$

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการขจัดอนุมูล DPPH และ ABTS$^{\cdot+}$ โดยที่วิธี DPPH จะเป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระมักจะใช้กับสารที่ละลายในแอลกอฮอล์ ส่วนวิธี ABTS$^{\cdot+}$ จะเป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระมักจะใช้กับสารที่ละลายในน้ำและสารประกอบอินทรีย์ (Prior *et al.*, 2005) จากผลการทดลองพบว่าการสกัดสารด้วย 75% เอทานอล ได้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS$^{\cdot+}$ ดีที่สุด (2.4±0.21 μg/mL และ 2.98±0.42 μg/mL ตามลำดับ) และเมื่อนำไปทำการสกัดบริสุทธิ์บางส่วน พบว่ายังคงมีประสิทธิภาพที่ดี ส่วนการสกัดด้วย 95% เอทานอล และ 50% เอทานอล ให้ประสิทธิภาพรองลงมาตามลำดับ ดังแสดงในTable 2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ที่ทำการสกัดสารสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทานอล:น้ำ (75% และ 50% เอทานอล) พบว่าที่ 75% มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH และ ABTS$^{\cdot+}$ ได้มากกว่าที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล (Do *et al.*, 2014; Paramasivam *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015) ชี้ให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์เอทานอลมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย ยิ่งไปกว่านั้นหากพิจารณาจากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจะพบว่าสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตทมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนด้วยน้ำ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Badami และคณะ (Badami *et al.*, 2003) ซึ่งได้ศึกษาการสกัดแก่นฝางด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ ทั้งนี้แม้ว่าการสกัดด้วย 50% เอทานอลในงานวิจัยนี้จะมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH และ ABTS$^{\cdot+}$ ได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับ 95% และ 75% เอทานอล แต่มีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูล DPPH และ ABTS$^{\cdot+}$ ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วย 50% เอทานอลในงานวิจัยก่อนหน้า (Sun *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2019)และพบว่าเมื่อนำไปทำการสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วนก็ยังมีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูล DPPH และ ABTS$^{\cdot+}$ ได้ดีเช่นเดียวกัน ในงานวิจัยครั้งนี้สนใจศึกษาสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีรายงานว่ามี

ความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยที่สารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในพืชเกือบทุกชนิดส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบมีขั้วละลายน้ำได้ (Halee *et al*., 2016)

ดังนั้นการเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายที่เหมาะสมจะทำให้สกัดสารในกลุ่มนี้ออกมาได้ตามหลักการละลายกันได้ (like dissolves like) เช่นเดียวกับการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 สามารถสกัดสารฟีนอลิกออกมาได้มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบของแก่นฝางมักจะประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ ทั้งที่ต้องการและไม่ต้องการ ในส่วนของการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจึงเป็นการแยกสารที่จำเพาะได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบ และมีรายงานก่อนหน้าพบว่าบราซิลีนสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและเอทิลอะซิเตท (Warinhomhaun *et al*., 2018) ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตทและน้ำอาจจะทำให้ได้ปริมาณบราซิลีนเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นได้

Table 2 The percent yield, total phenolic content, total flavonoid content, DPPH, $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging activity and *in vitro* anti-lipid peroxidation of *Caesalpinia sappan* heartwood extract

Fraction	Extraction yield (%)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CE/g)	IC_{50} (μg/mL)		
				DPPH	$ABTS^{\bullet+}$	MDA
95% Ethanol						
95C	10.06	661.99±2.89^{c}	759.88±16.51^{a}	2.79±0.23^{b,c,d}	3.27±0.27^{c,d,e}	20.56±0.39^{c,d}
95E	0.20	508.36±4.08^{f}	466.73±8.85^{d}	3.45±0.04^{e}	2.62±0.18^{a,b}	20.31±0.05^{c}
95W	0.03	750.43±2.26^{a}	355.68±7.42^{e}	2.94±0.16^{c,d}	2.42±0.16^{a}	138.73±5.11^{g}
75% Ethanol						
75C	12.14	741.84±3.25^{b}	640.31±6.02^{b}	2.4±0.21^{a,b}	2.98±0.42^{b,c,d}	14.21±0.47^{b}
75E	0.18	519.84±6.21^{e,f}	305±6.37^{f}	2.24±0.25^{a}	2.38±0.32^{a}	20.08±0.17^{c}
75W	0.04	608.13±3.04^{d}	271.42±2.52^{g}	2.56±0.17^{a,b,c}	2.19±0.2^{a}	119.16±3.62^{f}
50% Ethanol						
50C	11.62	616.73±2.53^{d}	547.12±3.56^{c}	3.87±0.16^{f}	4.00±0.14^{f}	42.73±0.05^{e}
50E	0.17	381.17±1.88^{g}	308.21±5.99^{f}	4.46±0.21^{g}	3.22±0.18^{c,d,e}	21.81±0.04^{d}
50W	0.06	557.91±6.31^{e}	198.58±3.11^{h}	4.25±.027^{g}	4.55±0.25^{g}	175.78±2.16^{h}
BHT	-	-	-	13.21±0.27^{h}	2.92±0.44^{b,c}	1.23±0.19^{a}

Different superscript letters mean significant difference ($p<0.05$) using one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test.

3.3 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในหลอดทดลองของสารสกัดจากแก่นฝาง พบว่าแก่นฝางที่สกัดด้วย

75% เอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมันดีที่สุดในทุกชั้นของการสกัด (75C = 14.21±0.47 μg/mL, 75E = 20.08±0.17 μg/mL และ 75W = 119.16±3.62 μg/mL) รองลงมาคือ 95% และ 50% เอทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในTable 2 จากรายงานก่อนหน้าพบว่าการสกัดสารด้วยเอทานอล/น้ำ (70/30 ปริมาตร/ปริมาตร) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้มากกว่าการสกัดด้วยน้ำและเอทานอลเพียงอย่างเดียว (Carvalho *et al.*, 2018; Morakinyo *et al.*, 2011; Sunday Joel *et al.*, 2017) ซึ่งการสกัดด้วยเอทานอล/น้ำ สามารถสกัดสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า เช่น สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Luthria *et al.*, 2006) ซึ่งสารในกลุ่มนี้ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันได้โดยที่สารประกอบฟีนอลิกจะมีวงแหวนอะโรมาติกที่เชื่อมกับหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้อนุมูลอิสระมีความเป็นกลาง ซึ่งกลไกนี้สามารถหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและลดการเกิดมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้ (Halliwell, 2012)

3.4 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากแก่นฝาง

การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และฟลาโวนอยด์รวม (flavonoid) ในสารสกัดจากแก่นฝาง ซึ่งสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก สารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซินมีหมู่ ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลนี้เป็นตัวที่ทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลิสระ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการสกัดด้วย 75% เอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด รองลงมาคือ 95% เอทานอลและ 50% เอทานอลตามลำดับ และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ชั้นน้ำให้ปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าชั้นเอทิลอะซิเตท ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์รวมพบว่าให้ผลเช่นเดียวกับปริมาณฟีนอลิกรวมคือการสกัดด้วย 75% เอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด แต่การทำให้บริสุทธ์บางส่วนที่ชั้นเอทิลอะซิเตทให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าชั้นน้ำ ดังแสดงในTable 2 ซึ่งในส่วนของชั้นน้ำอาจจะได้สารที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เช่น คาร์โบไฮเดรตและเทอพีน มากกว่าเอทานอลและเมทานอล (Do *et al.*, 2014)

3.5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝาง

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมที่พบในสารสกัดจากแก่นฝาง โดยในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ครั้งนี้ได้จัดกลุ่มสารตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) สารสกัดหยาบ 2) สารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนด้วย เอทิลอะซิเตท และ 3) สารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนด้วยน้ำ ซึ่งในแต่ละกลุ่มนั้นจะมีความแตกต่างกันที่เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ใช้ เพื่อจะชี้ให้เห็นถึงผลของการใช้ความเข้นข้นเอทานอลที่แตกต่างกันส่งผลต่อองค์ประกอบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้และบ่งชี้ได้ว่ากระบวนการใดที่แสดงถึงวิธิการสกัดที่เหมาะสมที่สุด

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสารสกัดในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตท พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH, $ABTS^{\cdot+}$ และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ในระดับความสัมพันธ์สูง R>0.7) และมีนัยสำคัญทางสถิติ (ρ<0.01) แต่

ความสัมพันธ์ของปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลาง(สารสกัดหยาบ) และระดับต่ำ(สารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตท) และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในTable 3 และ 4 ส่วนสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนด้วยน้ำให้ผลตรงข้ามกับทั้งสองกลุ่ม คือ ปริมาณฟีนอลิกรวมไม่มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH, $ABTS^{\cdot+}$ และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ในขณะที่ปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH, $ABTS^{\cdot+}$ มีความสัมพันธ์สูง แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ดังแสดงใน Table 5

Table 3 The correlation between phytochemical contents and antioxidant activities (Crude extract)

	TP	TF	DPPH	$ABTS^{\cdot+}$	MDA
TP	1	0.272	0.892**	0.789*	0.975**
TF	0.272	1	0.520	0.434	0.461
DPPH	0.892**	0.520	1	0.682**	0.949**
$ABTS^{\cdot+}$	0.789*	0.434	0.682**	1	0.784*
MDA	0.975**	0.461	0.949**	0.784*	1

* is significantly different ($p<0.05$), ** is significantly different ($p<0.01$)

Table 4 The correlation between phytochemical contents and antioxidant activities (partial purification with ethyl acetate)

	TP	TF	DPPH	$ABTS^{\cdot+}$	MDA
TP	1	0.420	0.737*	0.813**	0.984**
TF	0.420	1	-0.240	0.110	0.260
DPPH	0.737*	-0.240	1	0.630	0.840**
$ABTS^{\cdot+}$	0.813**	0.110	0.630	1	0.835**
MDA	0.984**	0.260	0.840**	0.835**	1

* is significantly different ($p<0.05$), ** is significantly different ($p<0.01$)

Table 5 The correlation between phytochemical contents and antioxidant activities (partial purification with water)

	TP	TF	DPPH	$ABTS^{\cdot+}$	MDA
TP	1	0.950**	0.425	0.556	0.164
TF	0.950**	1	0.654	0.765*	0.439
DPPH	0.425	0.654	1	0.937**	0.854**
$ABTS^{\cdot+}$	0.556	0.765*	0.937**	1	0.858**
MDA	0.164	0.439	0.854**	0.858**	1

* is significantly different ($p<0.05$), ** is significantly different ($p<0.01$)

4. สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการสกัดแก่นฝางด้วยตัวทำละลายที่มีสัดส่วนของเอทานอล/น้ำ ที่ต่างกัน พบว่าการสกัดสารด้วย 75% เอทานอลให้ปริมาณของสารสกัดมากที่สุดและได้ปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงกว่า รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำลายทีมีสัดส่วนของเอทานอล/น้ำ ที่ความเข้มข้น 95% และ 50% แสดงให้เห็นว่าที่ 75% เอทานอลนั้นสามารถสกัดได้สารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิดกว่าไม่เฉพาะสารที่มีขั้วมีขั้วอ่อน ๆ และไม่มีขั้วบางส่วนออกมาได้ด้วย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธีการทางเคมี และเมื่อนำสารสกัดหยาบไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตทพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ดังนั้นผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสกัดสารจากแก่นฝางสำหรับใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ฤทธิ์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป และประยุกต์ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์และเพิ่มมูลค่าเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ให้ดียิ่งขึ้น

5. กิติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. References

Badami, S., Moorkoth, S., Rai, S.R., Kannan, E., and Bhojraj, S., 2003, Antioxidant activity of Caesalpinia sappan heartwood, Biol Pharm Bull. 26: 1534-1537.

Batubara, I., 2009, Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: Antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities, J. Wood Sci. 55: 230-235.

Carvalho, A.A., Santos, L.R., Farias, R.R.S., Chaves, M. H., Feitosa, C. M., Vieira Júnior, G.M., Araújo, M.R.S., Ferreira, P.M.P., and Pessoa, C.Ó., 2018, Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from Bauhinia pulchella, Química Nova. 41: 405-411.

Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., and Ju, Y.H., 2014, Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica, J Food Drug Anal. 22: 296-302.

Halee, A. and Rattanapun, B., 2016, Effects of solvent type and concentration of citric acid on the extraction of antioxidants from Hom Nin Rice, KMUTT R&D Journal. 39(3): 353-364.

Halliwell, B., 2012, Free radicals and antioxidants: Updating a personal view, Nutr. Rev. 70: 257-265.

Hinkle, D.E., William, W., and J., S.G., 1998, Applied Statistics for the Behavior Sciences: 4thed, New York, Houghton Mifflin4thed, New York : Houghton Mifflin, 188 p.

Hu, C.M., Kang, J.J., Lee, C.C., Li, C.H., Liao, J.W., and Cheng, Y.W., 2003, Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin, Eur. J. Pharmacol. 468: 37-45.

Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, J Agric Food Chem. 53: 1841-1856.

Lee, Y.-R., Noh, E.-M., Han, J.-H., Kim, J.-M., Hwang, J.-K., Hwang, B.-M., Chung, E.-Y., Kim, B.-S., Lee, S.-H., Lee, S.J., and Kim, J.-S., 2012, Brazilin inhibits UVB-induced MMP- 1/ 3 expressions and secretions by suppressing the NF- KB pathway in human dermal fibroblasts, Eur. J. Pharmacol. 674: 80-86.

Luthria, D., Mukhopadhyay, S., and Kwansa, A., 2006, A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (Petroselinum crispum) as a model substrate, J. Sci. Food Agric. 86: 1350-1358.

Morakinyo, F., Oludare, G., Aderinto, O.T., and Tasdup, A., 2011, Antioxidant and free radical scavenging activities of aqueous and ethanol extracts of Zingiber officinale, Biol. Med. 3: 25-30.

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, Pharm Biol. 52: 1204-1207.

Nirmal, N.P., and Panichayupakaranant, P., 2015, Antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities of standardized brazilin-rich Caesalpinia sappan extract, Pharm Biol. 53: 1339-1343.

Nirmal, N.P., Rajput, M.S., Prasad, R.G., and Ahmad, M., 2015, Brazilin from Caesalpinia sappan heartwood and its pharmacological activities: A review, Asian Pac J Trop Med. 8: 421-430.

Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., 1979, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal Biochem. 95: 351-358.

Paramasivam, R., Sophia, D., Raj, D.C.A., Thangarajan, S., and Gopalakrishnan, V.K., 2012, Phytochemical screening, antioxidant activity of Aerva lanata (l) - An invitro study, Asian J Pharm Clin Res. 5: 77-81.

Potterat, O., 1997, Antioxidants and free radical Scavengers of natural origin, Curr. Org. Chem. 1: 415-440.

Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, J. Agric. Food Chem. 53: 4290-4302.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radic Biol Med. 26: 1231-1237.

Sasaki, Y., Hosokawa, T., Nagai, M., and Nagumo, S., 2007, In vitro study for inhibition of NO production about constituents of Sappan Lignum, Biol Pharm Bull. 30: 193-196.

Sireeratawong, S., Singhalak, T., Temsiririrkkul, R., Ruangwises, N., and Lerdvuthisopon, N., 2010, Toxicity evaluation of sappan wood extract in rats, J Med Assoc Thai. 93: 50-57.

Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., and Zhang, H., 2015, Effect of Ethanol/ Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts, Evid.-Based complementary Altern. med. 2015: 1-9.

Sunday Joel, J., Omoregie, E., Obuotor, E.M., Nwangwu, S., and Emmanuel, A., 2017, Comparative Antioxidant Capacity of Aqueous and Ethanol Fruit Extracts of Tetrapleura tetraptera, J. Biol. Sci. 17: 185-193.

Utarwuthipong, T., Komindr, S., Pakpeankitvatana, V., Songchitsomboon, S., and Thongmuang, N., 2009, Small dense low- density lipoprotein concentration and oxidative susceptibility changes after consumption of soybean oil, rice bran oil, palm oil and mixed rice bran/ palm oil in hypercholesterolaemic women, J Int Med Res. 37: 96-104.

Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D., 1998, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, J. Agric. Food Chem. 46: 4113-4117.

Warinhomhaun, S., Sritularak, B., and Charnvanich, D., 2018, A simple high-performance liquid chromatographic method for quantitative analysis of brazilin in caesalpinia sappan L. extracts, TJPS. 42: 208-213.

Warinhomhaun, S., Sritularak, B., Panapisal, V., and Charnvanich, D., 2016, Comparative study of semi- purification methods of Caesalpinia sappan L. Extract: Thin layer chromatography and free radical scavenging activity, TJPS. 40: 76-79.

Washiyama, M., Sasaki, Y., Hosokawa, T., and Nagumo, S., 2009, Anti- inflammatory constituents of Sappan Lignum, Biol Pharm Bull. 32: 941-944.

Xie, Y.W., Ming, D.S., Xu, H.X., Dong, H., and But, P.P., 2000, Vasorelaxing effects of Caesalpinia sappan involvement of endogenous nitric oxide, Life Sci. 67: 1913-1918.

Xu, H.X., and Lee, S.F., 2004, The antibacterial principle of Caesalpina sappan, Phytother Res. 18: 647-651.

Yin, P., Yang, L., Li, K., Fan, H., Xue, Q., Li, X., Sun, L., and Liu, Y., 2019, Bioactive components and antioxidant activities of oak cup crude extract and its four partially purified fractions by HPD- 100 macroporous resin chromatography, Arab. J. Chem. 12: 249-261.

Yodsaoue, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., and Tewtrakul, S., 2009, Anti- allergic activity of principles from the roots and heartwood of Caesalpinia sappan on antigen- induced beta- hexosaminidase release, Phytother Res. 23: 1028-1031.

You, E. J., Khil, L. Y., Kwak, W. J., Won, H. S., Chae, S. H., Lee, B. H., and Moon, C. K., 2005, Effects of brazilin on the production of fructose- 2,6- bisphosphate in rat hepatocytes, J Ethnopharmacol. 102: 53-57.

Yun, J., Lee, H. M., Kim, S. K., Lee, S. Y., Lee, C. S., and Cho, T. S., 2006, Formation of Cu(II)-brazilin complex in the presence of DNA and its activities as chemical nuclease, J Inorg Biochem. 100: 1501-1505.

Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., and Tang, T. , 2010, Analysis of Flavonoids in Portulaca oleracea L. by UV– Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies, Food Anal. Methods. 3: 90-97.