Research Article

Received: January 9, 2020; Accepted: May 8, 2020

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดฝาง

Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Activities of the *Caesalpinia sappan* L. Extract

จันทนา กาญจน์กมล*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ถนนอู่ทองนอก แขวงดุสิต เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300

Chantana Kankamol*

Department of Applied Science, Faculty of Science and Technology,

Suan Sunandha Rajabhat University, U-Thong Nok Road, Dusit, Bangkok 10300

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก และเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ของสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝาง (*Caesalpinia sappan* Linn.) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคใช้วิธี agar well diffusion ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบใช้วิธี DPPH radical scavenging assay และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งปอดวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC13311) และ *Vibrio cholera* (non 01, non 0139, DMST2873) โดยมีค่า MIC 0.313, 0.500 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐาน BHT โดยสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางมีค่า IC_{50} = 35.26±2.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT (IC_{50} = 463.70±34.20 µg/mL) ประมาณ 13.15 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งปอดเซลล์เล็ก 78.08 และ 80.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง; ฝาง

Abstract

The purposes of this research were to investigate antibacterial activity, antioxidant activity and anti-cancer activities against human cell lines, KB oral cavity cancer and NCI-H187 small lung

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** Chantana.ka@ssru.ac.th **doi:** 10.14456/tstj.2021.27

cancer of the methanolic extract of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood. The antibacterial activity was examined by using agar well diffusion method. The antioxidant activity was determined using DPPH radical scavenging assay. The anti-cancer activities against KB oral cavity cancer and NCI-H187 small lung cancer were analyzed by the Bio-resources Technology Unit (BTU), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC). The research results were that the methanolic extract of *C. sappan* heartwood exhibited strong antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC13311) and *Vibrio cholera* (non 01, non 0139, DMST2873) with MIC values of 0.313, 0.500 and 0.625 mg/mL, respectively. For analyzing the antioxidant activity, it was found that the methanolic extract was about 13.15 times higher antioxidant activity (IC_{50} = 35.26±2.08 µg/mL) than that of BHT (butylated hydroxytoluene) standard (IC_{50} = 463.70±34.20 µg/mL). Moreover, the methanolic extract at a concentration of 50 µg/mL exhibited anti-cancer activities against human cell lines, KB oral cavity cancer and NCI-H187 small lung cancer with inhibition activities of 78.08 and 80.75 %, respectively.

Keywords: antibacterial activity; antioxidant activity; anticancer activity; *Caesalpinia sappan*

1. บทนำ

ฝางจัดอยู่ในวงศ์ Caesalpiniaecaea มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Caesalpinia sappan* Linn. ชื่อสามัญ คือ Sappan ส่วนชื่อพื้นเมืองมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน ได้แก่ ภาคกลางเรียกว่าฝางแดงหรือฝางเสน กาญจนบุรีเรียกว่าง้าย แพร่เรียกว่าหนามโค้ง เป็นต้น มักพบตามเขาหินปูนที่แห้งแล้งหรือป่าดงดิบ พบประปรายทั่วไปตามป่าเบญจพรรณ โดยเฉพาะทางภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย รวมทั้งยังพบในประเทศอื่น ๆ ที่อยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทวีปแอฟริกา [1] ฝางเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของประเทศไทย มีลักษณะเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 5-8 เมตร มีหนามแข็งทั่วทั้งลำต้น ใบมีลักษณะเหมือนใบมะขาม ดอกเป็นช่อมีสีเหลืองขนาดใหญ่ เนื้อไม้เป็นสีส้มอ่อน แก่นมีสีแดงออกส้มเข้ม มีองค์ประกอบของสารแทนนิน ซึ่งมีสรรพคุณทางยาหลายประการ ได้แก่ แก้ท้องเสีย เป็นยาบำรุงโลหิต ขับเสมหะ ขับระดู แก้ไข้ แก้ร้อนใน แก้กระหายน้ำ ป้องกันโรคหืด ป้องกันการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ (anticonvulsant) ต้านการเกิดสิว (anti-acne) [2] ต้านการเกิดโรคเก๊าท์ (gout) [3] ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) [4] ต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านรา (antifungal) เป็นต้น [5] เมื่อนำแก่นฝางมาฝนด้วยน้ำสะอาดจะได้สารละลาย นำมาใช้ทาบริเวณที่น้ำกัดเท้าและแผลเปื่อยพุพอง ดังนั้นจึงได้มีการนำฝางมาพัฒนาเป็นยาสมุนไพรรักษาโรค โดยสารสกัดที่ได้จากแก่นฝางมีสารบราซิลิน (brazilin) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งพบในปริมาณมากที่สุด เนื่องจากให้สีแดงจึงนำมาแต่งสีแดงของน้ำยาอุทัย ใช้เป็นสีปรุงอาหารหรือแต่งสีขนมหวานที่ให้ความปลอดภัย นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง รวมทั้งใช้ย้อมผ้าฝ้ายและผ้าไหม [6] ด้วยสมบัติและศักยภาพดังกล่าวจึงทำให้ฝางได้รับความสนใจในการใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ซึ่งเป็น *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams พบว่าสารสกัดเมทานอลจากฝางมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ MRSA ดีกว่าสารสกัดบิวทานอล คลอโรฟอร์ม และน้ำ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดฝางที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibition concentration, MIC) คือ 20-80 µg/mL [7] นอกจากนี้สารสกัดจากฝางยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในลำไส้ [8] รวมทั้งแบคทีเรียชนิดอื่นอีกหลายชนิด ได้แก่ *S. aureus, Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านรา ได้แก่ *Candida albicans*, *Cryptococcus albidus* เป็นต้น [9]

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากฝางพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (free radical) ได้ผลดี โดยอนุมูลอิสระหมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ในอะตอมหรือโมเลกุล เป็นสารที่ไม่เสถียร สามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปอย่างว่องไว เพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร อนุมูลอิสระพบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกายและเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกาย ซึ่งจะทำลายชีวโมเลกุลต่าง ๆ ของร่างกายทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต ในสภาวะที่มีความผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ที่อยู่ภายในร่างกาย และเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายได้ อีกทั้งยังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ รวมทั้งอาจทำให้เกิดโรคในระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ได้แก่ โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคมะเร็งผิวหนังบางชนิด โรคหัวใจขาดเลือด โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergy) เป็นต้น โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้จะถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงลงด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งมาจากสารสังเคราะห์หรือสารที่ได้จากธรรมชาติ (natural antioxidant) [10] ปัจจุบันมีผู้บริโภคนิยมใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ปลอดสารเคมีมากขึ้น เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีความปลอดภัยในการใช้มากกว่าสารสังเคราะห์ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฝางด้วยวิธี DPPH และวิธี nitric oxide ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) พบว่าสารสกัดจากฝางที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเทต เมทานอล และน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดชนิดอื่น [11] นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากฝางที่เติมลงไปในน้ำมันถั่วลิสงบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 60±0.5 องศาเซลเซียส (°C) ผลของการทดสอบพบว่าต้านการเกิดออกซิเดชันได้ดีมาก [12]

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝาง ผลวิจัยดังกล่าวจะเกิดประโยชน์อย่างมากต่อการนำสารสกัดจากฝางซึ่งเป็นสมุนไพรไทยมาพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัย สามารถสร้างมูลค่าเพิ่ม และสนับสนุนการนำสารสกัดจากฝางมาใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรม นำมาใช้เป็นยารักษาโรค ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ นอกจากนี้สารสกัดจากฝางยังนำมาใช้เป็น

ส่วนผสมของอาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอีกด้วย ฝางจึงเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์ทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วิธีการสกัดสารสำคัญ

นำแก่นฝางมาอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 42 ºC นาน 72 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผงหยาบด้วยเครื่องบด ชั่งแก่นฝางที่บดแล้ว 20 กรัม เติมตัวทำละลายเมทานอล 200 mL นำไปสกัดด้วยเครื่องซอกห์เลต (Soxhlet extractor) โดยสกัดที่อุณหภูมิ 60-70 ºC เพื่อให้เมทานอลระเหยเป็นไอแล้วเกิดการควบแน่นเป็นของเหลว เกิดการสกัดซ้ำไปเรื่อย ๆ เป็นเวลานานประมาณ 15 ชั่วโมง นำสารสกัดไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบที่แห้งสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

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

2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

นำสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ได้แก่ *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella* Typhimurium (ATCC13311) และ *Vibrio cholera* (non 01, non 0139, DMST2873) การทดสอบใช้วิธี agar well diffusion โดยนำแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มาเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับค่าความขุ่น ให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน McFarland 0.5 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

2.2.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ดัดแปลงจากวิธีการของ Parekh และ Chanda) [13]

นำเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (µL) เติมลงในอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) 20 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และวางในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 ºC ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ เทใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว รอให้วุ้นแข็งโดยผึ่งในตู้ปลอดเชื้อเพื่อให้ผิวหน้าแห้ง จากนั้นนำปลายพาสเจอร์ปิเป็ต (Pasteur pipette) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มาเจาะหลุม (well) บนอาหารแข็งจานละ 6 หลุม แล้วหยดสารสกัดฝางที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/mL) ลงในหลุมหลุมละ 50 µL จะได้ปริมาณสารสกัด 1.0 มิลลิกรัมต่อหลุม (mg/well) โดยใช้สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 1 mg/mL และ ofloxacin (5 µg/disc) เป็น positive control สำหรับ negative control ใช้ 1 % DMSO จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 16 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต ($\bar{X}$) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

2.2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ (MIC) ด้วยวิธี agar well diffusion

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแก่นฝางที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion โดยนำสาร

สกัดฝางมาเจือจางแบบให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 2 เท่า (serial two-fold dilution) หยดสารสกัดลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารแข็ง หลุมละ 50 µL โดยใช้สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 1 mg/mL เป็น positive control และ 1 % DMSO เป็น negative control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 ชั่วโมง ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากแก่นฝางใช้วิธีกำจัดอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) ดัดแปลงจากวิธีของ Sana และคณะ [14]

เตรียมสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางและสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย เติมสารสกัดจากแก่นฝางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ลงในหลอดตัวอย่างแต่ละหลอด ส่วนหลอดสารละลายมาตรฐานเติมสาร BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตร 500 µL ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ (mM) ปริมาตร 500 µL บ่มที่อุณหภูมิ ในห้องที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (nm) โดยทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากสมการ % DPPH radical scavenging activity = [(A - B) ÷ A] x 100 โดย A เป็นค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม (ซึ่งประกอบด้วยสารทั้งหมดยกเว้นตัวอย่างทดสอบ) และ B เป็นค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างทดสอบ จากนั้นเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical scavenging activity) และความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อหาค่า IC_{50} (concentration of sample required to scavenge 50 % of DPPH radical) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 %

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์

ส่งตัวอย่างสารสกัดจากแก่นฝางไปทดสอบสมบัติการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (anti-cancer, KB oral cavity cancer) และมะเร็งที่ปอด (anti-cancer, NCI-H187-small cell lung cancer) ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งการทดสอบใช้วิธี resazurin microplate assay (REMA) เซลล์ที่ใช้ทดสอบ คือ cell line ของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ สารควบคุมผลลบ (negative control) คือ 1 % DMSO และสารควบคุมผลบวก (positive control) คือ ellipticine และ doxorubicine

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต ($\overline{X}$) และการหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

3. ผลการวิจัย

3.1 การสกัดสารสำคัญ

นำแก่นฝางที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 72 ชั่วโมง จนแห้งสนิท (รูปที่ 1a) มาสกัดด้วยเครื่องซอกห์เลต โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย เมื่อสกัดนาน 15 ชั่วโมง จะได้สารสกัดสีแดงอมส้ม (รูปที่ 1b) นำไประเหยเมทานอลออก โดยใช้ rotary evaporator ได้ปริมาณสารสกัด 170 มิลลิกรัม (mg)/น้ำหนักแห้งของพืชตัวอย่าง 1 กรัม (g) หรือคิดเป็น % yield (w/w) = 17 เก็บสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

(a)

(b)

Figure 1 (a) *Caesalpinia sappan* heartwood was dried in hot air oven at 42 ºC for 72 hours. (b) The methanolic extract of *C. sappan* was evaporated to dryness under vacuum using a rotary evaporator.

Table 1 The antibacterial activity of the methanolic extract of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood against the human pathogenic bacteria.

Samples	Zone of inhibition (mm)			
	S. aureus	*E. coli*	*S.* Typhimurium	*V. cholera*
The methanolic extract of *Caesalpinia sappan* L. heartwood (20 mg/mL)	21.00±1.73	ND	18.00±1.24	15.67±0.58
Ampicillin (1 mg/mL) (positive control)	16.00±2.83	9.33±0.58	13.50±2.12	10.00±1.25
Ofloxacin (5 µg/disc) (positive control)	23.80±1.94	22.60±0.49	25.20±1.33	24.60±1.36
DMSO (negative control)	ND	ND	ND	ND

Values are expressed as means ± S.D.; ND = not detected

Table 2 The minimum inhibition concentration (MIC) of the methanolic extract of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood against pathogenic bacteria.

Microorganisms	MIC (mg/mL)
S. aureus	0.313
S. Typhimurium	0.500
V. cholera	0.625

3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

พบว่าสารสกัดจากแก่นฝางมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *S.* Typhimurium และ *V. cholera* บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 21.00±1.73, 18.00±1.24 และ 15.67±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่พบการยับยั้งการเจริญของ

E. coli (ตารางที่ 1) โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ต่อ *S. aureus*, *S.* Typhimurium และ *V. cholera* คือ 0.313, 0.500 และ 0.625 mg/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

3.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging sssay

ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากแก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่ามีค่า IC_{50} = 35.26±2.08 µg/mL ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ของตัวควบคุมบวก BHT มีค่า IC_{50} = 463.70±34.20 µg/mL จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า BHT ถึง 13.15 เท่า (ตารางที่ 3)

3.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งปอด

การทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งปอดของสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝาง ซึ่ง negative control คือ 1 % DMSO ส่วน positive control คือ ellipticine และ doxorubicine โดยการทดสอบนี้ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4

การแปลผลการทดสอบใช้ค่า % inhibition activity โดยกำหนดให้ % inhibition activity น้อยกว่า 50 % หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (inactive) % inhibition activity มากกว่า 50 % หมายถึง มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (active)

ตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งปอดได้ (active) โดยมีค่า % inhibition คือ 78.08 และ 80.75 ตามลำดับ

Table 3 The antioxidant activity of the methanolic extract of *Caesalpinia sappan* L. heartwood determined using DPPH radical scavenging assay.

Samples	IC_{50}[a] (µg/mL)
The methanolic extract of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood	35.26±2.08
BHT[b]	463.70±34.20

[a] Each value represents the mean ± SD (n = 9); [b] BHT was used as standards for DPPH radical scavenging.

4. วิจารณ์ผลการวิจัยและสรุป

ผลจากการสกัดสารสำคัญจากแก่นฝางโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าให้ปริมาณสารสกัดเป็น 170 mg/น้ำหนักแห้ง 1 กรัม (g) คิดเป็น % yield (w/w) คือ 17 โดยสารที่ละลายได้ดีในเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงมักเป็นสารสำคัญที่มีสมบัติมีขั้วค่อนข้างสูง สารประเภทนี้อาจเป็นสารประกอบฟินอลิก (phenolic compound) ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ฟีนอลิกไดเทอร์พีนส์ (phenolic diterpene) เป็นต้น [5] ซึ่งสารดังกล่าวมีความสามารถในการต้านการเจริญของแบคทีเรียและต้านออกซิเดชันได้ดี มีรายงานการแยกสารออกฤทธิ์ (active compound) ของสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ซึ่งพบว่าได้สารสำคัญ คือ brazilin, protosappanin A และ sappanone B โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร brazilin มีสมบัติต้านแบคทีเรียได้ดี สำหรับการทดสอบสมบัติ

การต้านอนุมูลอิสระของสาร brazilin ในสารสกัดฝาง ได้ค่า IC_{50} = 8.8 µM ดังนั้นสาร brazilin จึงมีศักยภาพสูง สามารถนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีรายงานว่าสามารถต้านการเกิดสิว (anti-acne agent) ด้วย [2]

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบสมบัติการต้านแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด แบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* (ATCC25923) และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* (ATCC25922), *S.* Typhimurium (ATCC13311) และ *V. cholera* (non 01, non 0139, DMST2873) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางที่ความเข้มข้น 20 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ดีที่สุด ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งขนาด 21.00±1.73 มิลลิเมตร รองลงมา คือ *S.* Typhimurium และ *V. cholera* ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งขนาด 18.00±1.24 และ 15.67±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะ ampicillin (1 mg/mL) และ ofloxacin (5 µg/disc) พบว่าสารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด เนื่องจากเป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์กว้างขวาง สามารถทำลายทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ผลการทดสอบสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางของการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในลำไส้ *E. coli* ต่อสารสกัดจากฝาง ซึ่งพบว่าสารสกัดฝางไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ [8] สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* มักมีความทนทานต่อสารสกัดจากพืช เนื่องจากมีการสร้างแคปซูล (capsule) ที่หนามาก มีชั้นไขมันปกคลุมผนังเซลล์ไว้ ทำให้สารสกัดสมุนไพรไม่สามารถผ่านแคปซูลหรือชั้นไขมันที่ปกคลุมผิวนอกเพื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้แบคทีเรียยังคงมีการเจริญเติบโต จึงทำให้ไม่เกิดวงใสรอบหลุมที่ใส่สารสกัด [16,17] ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่ฝางมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus*, *S.* Typhimurium และ *V. cholera* ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดฝางต่อเชื้อ MRSA ที่บุกรุก human mucosal fibroblast (HMF) โดยพบว่าสารสกัดจากคลอโรฟอร์ม

Table 4 The anticancer activities against human cell lines, KB oral cavity cancer and NCI-H187 small lung cancer of the methanolic extract of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood.

Samples	KB-oral cavity cancer			NCI-H187-small cell lung cancer		
	IC_{50}	% inhibition	Activity	IC_{50}	% inhibition	Activity
The methanolic extract of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood	-	78.08	active	-	80.75	active
Ellipticine[a]	0.553	-	active	1.390	-	active
Doxorubicine[a]	0.222	-	active	0.073	-	active
1 % DMSO[b]	-	0	inactive	–	0	inactive

[a] Ellipticine and Doxorubicine as positive control; [b] 1 % DMSO as negative control.

บิวทานอล และเมทานอลแสดงสมบัติต้านเชื้อ MRSA ได้ และสารสกัดเมทานอลยังต้านแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดบิวทานอลและคลอโรฟอร์ม [7] อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดจากเนื้อไม้โดยใช้ 70 % เอทานอล ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Shigella flexneri, V. Cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *S. Aureus* ได้ [18]

มีการนำสารสกัดเมทานอลจากฝางมาสกัดต่อตามลำดับด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเทต บิวทานอล และน้ำ จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 21 ชนิด พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเทตมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus, Staphylococcus, Eschelichea, Pseudomonase, Salmonella, Klebsiella* และ *Enterobacter* มีค่า MIC = 0.2 mg/mL และการนำสารสกัดเอทิลอะซิเทตจากฝางไปแยกให้บริสุทธิ์โดย ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ MS พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ brazilin [19] สารสกัดจากฝางยังมีประโยชน์อีกหลายอย่าง เช่น สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านการเกิดสิว (anti-acne activity) [1] สารสกัด 50 % เอทานอลจากแก่นฝาง มีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* และสามารถต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนู (rat) ที่ทำให้เกิดการอักเสบจากการฉีดคาราจีนิน (carrageenin) ขนาด 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม [20] และที่ความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 10 µg/mL มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด aorta ของช่องอกหนู [21]

Badami และคณะ [11] ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นฝางที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่าสารสกัดเมทานอลสามารถกำจัดอนุมูลอิสระดีที่สุด ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 % (IC_{50}) คือ 1.44±0.12 µg/mL ส่วนค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางของการวิจัยนี้มีค่า 35.26±2.08µg/mL แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีเช่นกัน แต่ค่า IC_{50} อาจต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดสายพันธุ์ สภาพแวดล้อมในการปลูก วิธีการสกัดสาร ฤดูกาลในการเก็บเกี่ยว ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างพืช เป็นต้น [11]

นอกจากนี้สารสกัดจากแก่นฝางยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด malondialdehyde (MDA) ซึ่งสารนี้พบได้ในธรรมชาติและเป็นสารตั้งต้นในการเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) [22] และยังพบว่าสารสกัดจากแก่นฝางที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล เมทานอล : น้ำ (1 : 1) และน้ำ สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ human HT-1080 fibrosarcoma cell โดยให้ค่า EC_{50} = 15.8, 13.8 และ 17.8 µg/mL ตามลำดับ [23] สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดเมทานอลจากแก่นฝางที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB oral cavity cancer) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187 small lung cancer) ซึ่งเป็น cell line ของมนุษย์ (human cell line) ด้วยเช่นเดียวกัน โดยมีค่า % inhibition คือ 78.08 และ 80.75 ตามลำดับ

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าฝางเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูง สารสกัดจากแก่นฝางมีศักยภาพหลายประการ เช่น มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งของ human cell line ดังนั้นสารสกัดจากแก่นฝางจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ ใช้เป็นยารักษาโรคแทนยาปฏิชีวนะ ใช้เป็นสารให้สีเพิ่มความสวยงามให้แก่ผลิตภัณฑ์ ทั้งเครื่องสำอาง อาหาร และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับสมุนไพร เช่น การสกัดสารออกฤทธิ์ การวิเคราะห์

ทดสอบสารออกฤทธิ์ จะก่อให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์ เพื่อให้เป็นที่ยอมรับและมีความต้องการมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทยได้อีกทางหนึ่ง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัย และขอขอบคุณ ศ.ดร.วิชัย ศรีคำ ที่กรุณาตรวจแก้ไขบทความ

6. References

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

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

[3] Nguyen, M.T.T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q. L. and Kadota, S. , 2005, Xanthine Oxidase Inhibitors from the Heartwood of Vietnamese *Caesalpinia sappan*, Chem. Pharm. Bull. 53: 984-988.

[4] Wu, S.Q., Otero, M., Ungera, F.M., Goldring, M.B., Phrutivorapongkul, A., Chiari, C., Kolb, A., Viernstein, H. and Toegel, S., 2011, Anti- inflammatory activity of an ethanolic *Caesalpinia sappan* extract in human chondrocytes and macrophages, J. Ethnopharmacol. 138: 364-372.

[5] 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.

[6] Wetwitayaklung, P., Phaechamudb, T. and Keokitichaic, S., 2005, The antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* L. heartwood in various ages, Naresuan Univ. J. 13: 43-52.

[7] Kim, K.J., Yu, H.H., Jeong, S.I., Cha, J.D., Kim, S.M. and You, Y.O., 2004, Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*, J. Ethnopharmacol. 91: 81-87.

[8] Lim, M.Y., Jeon, J.H., Jeong, E.Y., Lee, C.H. and Lee, H.S., 2007, Antimicrobial activity of 5- hydroxy- 1,4- naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria, Food Chem. 100: 1254-1258.

[9] Kang, S.N., Do, J.R., Kim, K.J., Jo, J.H. and Lee, S.W., 2004, Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants, Food Sci Biotechnol. 13: 640-645.

[10] Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C., 2008, Free radicals, antioxidants in disease and health, Int. J. Biomed. Sci. 4: 89-96.

[11] 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.

[12] Yingming, P., Ying, L., Hengshan, W. and Min, L., 2004, Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs, Food Chem. 88: 347-350.

[13] Parekh, J. and Chanda, S., 2006, *In vitro* antimicrobial activities of extracts of *Launaea procumbens* Roxb. (Labiateae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae), Afr. J. Biomed. Res. 9: 89-93.

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

[15] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M., 2003, Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum accessions*, Food Chem. 83: 547-550.

[16] Alzoreky, N.S. and Nakahara, K., 2003, Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, Int. J. Food Microbiol. 80: 223-230.

[17] Maregesi S.M., Pieters, L., Ngassapa, O.D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., Vanden Berghe, D.A. and Vlietinck, A.J., 2008, Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities, J. Ethnopharmacol. 119: 58-66.

[18] Gritsanapan, W. and Chulasiri, M., 1983, A preliminary study of antidiarrheal plants: I, antibacterial activity, Mahidol Univ. J. Pharm. Sci. 10: 119-122.

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

[20] Hikino, H., Toguchi, T., Fujimura, H. and Hiramatsu, Y., 1977, Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood, Plant. Med. 31: 214-220.

[21] Xie, Y.W., Ming, D.D., 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.

[22] Jun, H., Xiaoling, Y., Wei, W., Hao, W., Lei, H. and Lijun, D., 2008, Antioxidant activity *in vitro* of three constituents from *Caesalpinia sappan* L., Tsinghua Sci. Technol. 13: 474-479.

[23] Ueda, J.Y., Tezuka, Y., Banskota, A.H., Tran, Q.L., Tran, Q.K., Harimaya, Y., Saiki, J. and kadota, S., 2002, Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants, Biol. Pharm. Bull. 25: 753-760.