*http://journal.rmutp.ac.th/*

# พฤกษเคมีและกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

นิภัทร เปี่ยมอรุณ[1]* นันทพร มูลรังษี[1] อาภาพร บุญมี[1] สุนิษา สุวรรณเจริญ[1]
ธีรพิชญ์ เกษมสุข[1] และ จรูญ จักร์มุณี[2]

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
[2] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[1] เลขที่ 41 หมู่ 5 ตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี 22000
[2] เลขที่ 239 ถนนห้วยแก้ว ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

*รับบทความ 25 พฤศจิกายน 2561 แก้ไขบทความ 12 กรกฎาคม 2562 ตอบรับบทความ 19 สิงหาคม 2562*

## บทคัดย่อ

ภูมิปัญญาของไทยนำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณหลากหลาย แต่ยังไม่มีผลการวิจัยเชิงเคมีที่ประจักษ์ว่าผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ของไทยมีฤทธิ์รักษาโรคเกาต์ได้ งานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะผลห่ามและสุกมาศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคเกาต์ จากการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลพบว่าผลห่ามมีพฤกษเคมี คือ สารประกอบฟีนอลิก แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี ส่วนในระยะผลสุกให้ผลใกล้เคียงกันแต่ไม่พบซาโปนิน ผลการทดสอบสารสกัดหยาบผลมะม่วงหาวมะนาวโห่สามารถยับยั้งเอนไซม์ แซนทีนออกซิเดสได้ โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลให้ค่าร้อยละการยับยั้งที่สูงกว่าสารสกัดน้ำ และในสารสกัดหยาบ เอทานอลระยะผลห่ามมีฤทธิ์การยับยั้งที่สูงกว่าระยะผลสุกเล็กน้อย โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 2.40 ± 0.05 และ 2.87 ± 0.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ระยะการสุกที่ให้พฤกษเคมีต่างกันอาจมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ดังนั้นการเลือกช่วงการเก็บรวมถึงการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์จะช่วยในการพัฒนาเป็นยาสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ในอนาคตได้

**คำสำคัญ :** แซนทีนออกซิเดส; มะม่วงหาวมะนาวโห่; กรดยูริก; โรคเกาต์

***ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +66856637913, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: nipat.p@rbru.ac.th***

*http://journal.rmutp.ac.th/*

# Phytochemical and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of *Carissa carandas* L. Fruit Extract

Nipat Peamaroon[1]* Nuntaporn Moonrungsee[1] Apaporn Boonmee[1]
Sunisa Suwancharoen[1] Teerapich Kasemsuk[1] and Jaroon Jakmunee[2]

[1]Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University
[2]Faculty of Science, Chiang Mai University
[1]41 Moo 5, Tachang Sub-district, Muang District, Chanthaburi, Thailand, 22000
[2]239, HuayKaew Road, Suthep Sub-district, Muang District, Chiang Mai, Thailand, 50200

*Received 25 November 2018; Revised 12 July 2019 ; Accepted 19 August 2019*

## Abstract

The Thai wisdom knows the benefits of *Carissa carandas* L. to be used as a traditional herbal medicine. However, there was no scientific evidence to show that *Carissa carandas* L. of Thailand can treat gout or not. In this research, the *Carissa carandas* L. fruit extract in semi-ripening and ripe stage were studied for the phytochemical and inhibitory activity of xanthine oxidase, one of the causes of gout. The result of phytochemical indicated that the crude extract from semi-ripening stage fruit contained many substances; phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, terpenoids, saponins and deoxy sugars. While the ripe stage fruit contained the similar substances excepted saponins. The extract solution of *Carissa carandas* L. showed the xanthine oxidase inhibitory activity, as the ethanolic extract solution gave the higher activity than water extract solution. The crude extracts of semi-ripening stage fruit presented the higher activity than the ripe stage one with the $IC_{50}$ values of 2.40 ± 0.05 and 2.87 ± 0.37 mg/mL, respectively. The result of ripening stage with different phytochemical may be related to inhibition of xanthine oxidase activity. Therefore, the selecting of sampling period and purification of extract may be a choice for using as medicine for gout.

**Keywords :** Xanthine Oxidase; *Carissa carandas* L.; Uric Acid; Gout

**** Corresponding Author. Tel.: +66856637913, E-mail Address: nipat.p@rbru.ac.th***

## 1. บทนำ

มะม่วงหาวมะนาวโห่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Carissa carandas* L. อยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อสามัญคือ Karandas, Caranda, Christ's thorn และมีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น หนามขี้แฮด (เชียงใหม่) หนามแดง (กรุงเทพฯ) มะนาวไม่รู้โห่ (ภาคกลาง) และมะนาวโห่ (ภาคใต้) เป็นต้น [1] มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นพืชท้องถิ่นที่มีตำรายาไทยพื้นบ้านระบุว่าสามารถรักษาโรคได้หลายชนิด โดยมีการรายงานการพบสารสำคัญในส่วนต่าง ๆ ของมะม่วงหาวมะนาวโห่ เช่น ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะผลดิบ กึ่งสุก และสุก ตรวจพบวิตามินซี สารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่ต่างกัน [2], [3] นอกจากนี้ยังพบว่าในส่วนผลและราก มีฤทธิ์การต้านการอักเสบ ลดอาการปวด [4], [5] ในส่วนของใบช่วยลดไขมัน [6] ช่วยรักษาโรคมะเร็ง [7], [8] และมีรายงานว่าผลห่ามของมะม่วงหาวมะนาวโห่ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ [9] เป็นต้น

โรคเกาต์ (Gout) เกิดจากการที่ภาวะกรดยูริก (Uric Acid) ในร่างกายสูงกว่าปกติทำให้เกิดการตกตะกอนของผลึกเกลือโมโนโซเดียมยูเรต (Monosodium Urate) โดยจะตกตะกอนบริเวณข้อและรอบ ๆ ข้อ จนทำให้เกิดการอักเสบ ซึ่งเป็นการอักเสบของข้อชนิดเฉียบพลันที่พบได้บ่อยในมนุษย์ ความผิดปกติดังกล่าวเกิดจากการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine Oxidase) ที่สูงเกินกว่าปกติและอีกสาเหตุเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิวรีน (Purine) สูง ซึ่งพบมากในยอดอ่อนของผัก เครื่องในสัตว์และถั่วต่าง ๆ [10] การรักษาโรคเกาต์ที่ได้ผลคือการใช้ยาอัลโลพิวรินอล (Allopurinol) ซึ่งจัดเป็นยาในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine Oxidase Inhibitory) ทำให้ลดการสร้างกรดยูริกในร่างกายได้ แต่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ อย่างไรก็ตามพบว่ายาดังกล่าวมีผลข้างเคียงคือ เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร เป็นผื่นที่ผิวหนัง ทำให้ไตทำงานผิดปกติ และเป็นพิษต่อไตโดยเฉพาะผู้สูงอายุเนื่องจากการทำงานของไตลดลงตามวัย ทำให้ความสามารถในการขับยาและของเสียออกมาทางปัสสาวะน้อยลง [11] จากผลข้างเคียงดังกล่าว ทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจพืชสมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคเกาต์มากขึ้น เนื่องจากพืชสมุนไพรมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ยาสังเคราะห์ และสมุนไพรยังเป็นที่น่าสนใจของคนรักสุขภาพด้วยสรรพคุณและโภชนาการสูง [12]–[14] ในปัจจุบันคนหันมานิยมรับประทานผลมะม่วงหาวมะนาวโห่โดยหวังผลในการรักษาอาการปวดตามข้อหรืออาการป่วยจากโรคเกาต์ แต่อย่างไรก็ตามมีเอกสารวิชาการที่ระบุว่ามะม่วงหาวมะนาวโห่สามารถยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่เป็นสาเหตุของโรคเกาต์น้อยมาก

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำส่วนผลสดของมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะห่ามและสุกมาทำการสกัดด้วยน้ำและเอทานอลเพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสและใช้อัลโลพิวรินอลเป็นตัวควบคุมเชิงบวก ซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนายาสมุนไพรในการช่วยรักษาโรคเกาต์จากมะม่วงหาวมะนาวโห่และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรได้

## 2. ระเบียบวิธีวิจัย

### 2.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

#### 2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ จากต้นที่มีอายุมากกว่า 10 ปี จากพื้นที่ในตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม โดยเก็บผลของมะม่วงหาวมะนาวโห่แยกเป็นสองลักษณะคือ ผลห่ามที่มีสีชมพูถึงแดง และผลสุกที่มีสีม่วงเข้มถึงดำ มาทำการสกัดและทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

**2.1.2 การเตรียมตัวอย่าง**

นำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มาล้างให้สะอาด ผึ่งลม หั่นแยกเมล็ดออก และสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในการสกัดด้วยน้ำทำโดยการชั่งผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สับแล้วให้ได้น้ำหนัก 50 กรัม แล้วนำมาปั่นกับน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองแยกส่วนกากกับสารละลายออกจากกันด้วยผ้าขาวบาง และกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำโดยชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดด้วยวิธีการหมักแช่ โดยเติมเอทานอลร้อยละ 95 ลงไป 100 มิลลิลิตร แล้วปิดขวดรูปชมพู่ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้นาน 3 วัน ในที่มืด จากนั้นกรองแยกส่วนกากกับสารละลายของมะม่วงหาวมะนาวโห่ออกจากกันด้วยผ้าขาวบาง และกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ทำการแบ่งบางส่วนของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนำไปทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสและสารสกัดที่เหลือนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยเครื่องระเหยสุญญากาศเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ

## 2.2 สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

**2.2.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.5**

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen Phosphate, $Na_2HPO_4$, Analytical Reagent Grade, La Jota, Spain) หนัก 2.36 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมอนอไฮเดรต (Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate, $NaH_2PO_4{\cdot}H_2O$, Analytical Reagent Grade, Ajax Finechem, Australia) หนัก 1.15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.5

**2.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแซนทีนความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์**

เตรียมสารละลายแซนทีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งแซนทีน (Xanthine, $C_5H_4N_4O_2$, Sigma-Aldrich, China) หนัก 0.0570 กรัม ละลายด้วย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ปริมาตร 25.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

**2.2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานอัลโลพิวรินอล ความเข้มข้น 0.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ชั่งอัลโลพิวรินอล (Allopurinol, $C_5H_4N_4O$, Laboratory Reagent Grade, USA) หนัก 0.0340 กรัม ละลายด้วย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

**2.2.4 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร**

เตรียมสารละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยทำการละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine Oxidase, 5 ยูนิต Sigma-Aldrich, USA) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น

## 2.3 การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

ได้ทำการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น 8 ชนิด ตามเอกสารอ้างอิง [15]-[17] โดยมีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

**2.3.1 การตรวจสอบฟีนอลิก**

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.04 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่น แล้วเติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร 2-3 หยด ลงไปในของเหลว หากปรากฏสีเขียวปนดำ เขียวปนน้ำตาล

ม่วงดำปนน้ำตาล หรือน้ำเงินปนดำ แสดงว่าพบสารประกอบฟีนอลิก

**2.3.2 การตรวจสอบแอลคาลอยด์**

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.02 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไปหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Reagent) หากปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

**2.3.3 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์**

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.02 กรัม สกัดสีของสารสกัดออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ละลายสารสกัดส่วนที่เหลือด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น หากได้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

**2.3.4 การตรวจสอบแอนทราควิโนน**

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.02 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่น 5 นาที แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 2-3 หยด หากเกิดสีชมพูถึงแดงในชั้นด่าง แสดงว่าพบแอนทราควิโนน

**2.3.5 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์**

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.02 กรัม สกัดสีของสารสกัดออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมไดคลอโรมีเทน 2 มิลลิลิตร เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

**2.3.6 การตรวจสอบซาโปนิน**

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.02 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด แล้วนำมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้นนาน 30 นาที แสดงว่าพบซาโปนิน

**2.3.7 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์**

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม สกัดสีออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ละลายสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทำการทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test) โดยการเติมกรดแกลเชียลอะซิติก 3 หยด และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด ถ้าปรากฏสี น้ำเงิน หรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์ส่วนการทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซี ใช้การทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani Test) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก 1 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ประมาณ 1-2 หยด ผสมให้เข้ากันเอียงหลอดทดลอง ค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงไปตามผนังด้านในของหลอดทดลองให้เกิดการแยกชั้น หากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลแดงบริเวณรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี

**2.3.8 การตรวจสอบอิริดอยด์ไกลโคไซด์**

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมกรดอะซีติก 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟตร้อยละ 2 โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายกลายเป็นสีน้ำเงินหรือสีน้ำตาล แสดงว่าพบอิริดอยด์ไกลโคไซด์

## 2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีน-ออกซิเดสด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโต-มิเตอร์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิ-

เดสในสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ทำโดยวิธีที่ปรับมาจากเอกสารอ้างอิง [12] ขั้นตอนการทดสอบทำโดยผสมสารสกัดตัวอย่างช่วงความเข้มข้น 6.3-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์) 0.15 มิลลิโมลาร์ แซนทีน 300 ไมโครลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (pH 7.5) 550 ไมโครลิตร และเติม 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 50 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างสารสกัดในช่วง 0.63 - 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ผสมแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer, G10S, China) ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร บันทึกผลที่เวลาเริ่มต้นปฏิกิริยา และที่เวลาผ่านไป 5 นาที ในการทดลองนี้ใช้สารละลายมาตรฐานอัลโลพิวรินอลเป็นตัวควบคุมเชิงบวกช่วงความเข้มข้นสุดท้าย 0.2-6.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปทำการคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (%Inhibition) มีสูตรการคำนวณดังสมการที่ (1)

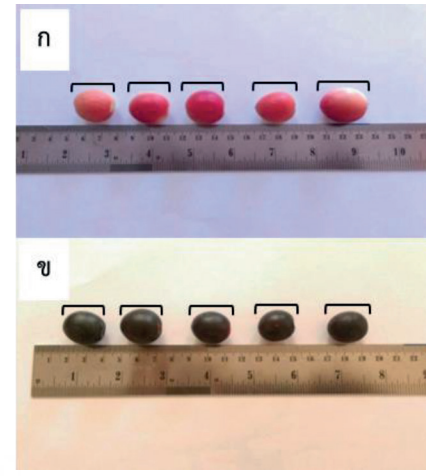
$$\%\text{Inhibition} = \frac{(\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}})}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่

$\Delta A_{\text{control}}$ = ผลต่างของการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่เวลาเริ่มต้นถึงเวลาที่ 5 นาที

$\Delta A_{\text{sample}}$ = ผลต่างของการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นถึงเวลาที่ 5 นาที

จากนั้นนำค่า %Inhibition ไปหาค่า $IC_{50}$ (ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ร้อยละ 50) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ




**รูปที่ 1** ตัวอย่างผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ก) ผลห่าม ข) ผลสุก

## 3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ได้ถูกแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือระยะผลห่ามและระยะผลสุก โดยที่ผลห่ามจะมีสีชมพูถึงแดง ส่วนผลสุกจะมีสีม่วงเข้มถึงดำ ผลห่ามมีขนาดเฉลี่ย 2.24 เซนติเมตร และผลสุกมีขนาดเฉลี่ย 2.14 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะผลห่ามและสุกได้ถูกนำมาสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ในส่วนของสารสกัดเอทานอลถูกนำไประเหยตัวทำละลายออกจนได้สารสกัดหยาบ ลักษณะของสารสกัดหยาบเอทานอล น้ำหนักและร้อยละผลผลิต แสดงดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** น้ำหนักและร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

| สารสกัดหยาบ | ลักษณะสารสกัดหยาบ | น้ำหนัก (กรัม) | ร้อยละผลผลิต |
|---|---|---|---|
| ผลห่าม | ของเหลวหนืดสีชมพูถึงแดง | 1.40 | 4.15 |
| ผลสุก | ของเหลวหนืดสีม่วงเข้มถึงดำ | 2.35 | 7.23 |

### 3.1 ผลการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลห่ามและผลสุกของมะม่วงหาวมะนาวโห่ 8 ชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และอิริดอยด์ไกลโคไซด์ ได้ผลแสดงดังตารางที่ 2 พบว่าทั้งผลห่ามและผลสุกให้พฤกษเคมีที่คล้ายกัน ตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และน้ำตาลดี-ออกซี ส่วนซาโปนินพบในผลห่ามแต่ไม่พบในผลสุก ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีรายงานเกี่ยวกับพฤกษเคมีเบื้องต้นในส่วนผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยเอทา-นอลหรือตัวทำละลายอื่น ๆ ไม่มากนัก โดยส่วนใหญ่ได้รายงานเป็นค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดซึ่งให้ผลแตกต่างกันออกไปตามลักษณะของตัวอย่างที่นำมาทดสอบและวิธีหรือตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด [2], [18], [19]

**ตารางที่ 2** พฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

| พฤกษเคมี | สารสกัดหยาบ | |
|---|---|---|
| | ผลห่าม | ผลสุก |
| สารประกอบฟีนอลิก | + | + |
| แอลคาลอยด์ | + | + |
| ฟลาโวนอยด์ | + | + |
| แอนทราควิโนน | - | - |
| เทอร์พีนอยด์ | + | + |
| ซาโปนิน | + | - |
| คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ | | |
| - สเตียรอยด์ | - | - |
| - น้ำตาลดีออกซี | + | + |
| อิริดอยด์ไกลโคไซด์ | - | - |

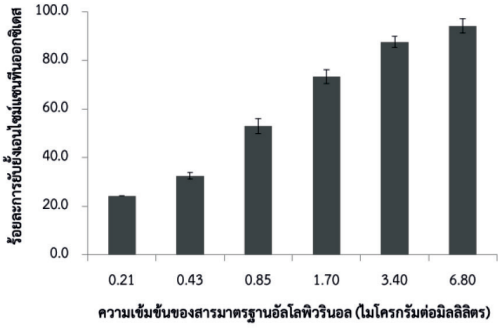
หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง ตรวจพบ
เครื่องหมาย – หมายถึง ตรวจไม่พบ

### 3.2 ผลการหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารมาตรฐานอัลโลพิวริ-นอล

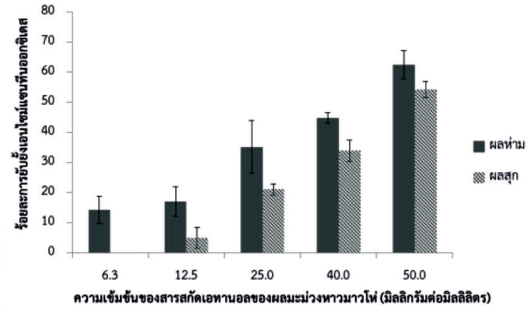
อัลโลพิวรินอลเป็นยาในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส โดยยับยั้งขั้นตอนการเปลี่ยนสารไฮโปแซนทีนเป็นแซนทีน และจากแซนทีนเป็นกรดยูริกในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการเมทาบอลิซึมของสารพิวรีนในร่างกายมนุษย์ ในการทดลองนี้จึงใช้สารมาตรฐานอัลโลพิวรินอลเป็นตัวควบคุมสำหรับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ได้ผลแสดงดังรูปที่ 2 พบว่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานอัลโลพิวรินอลเพิ่มขึ้น โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.79 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดน้ำและเอทานอลจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

จากการนำสารสกัดน้ำและเอทานอลของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะผลห่ามและผลสุกที่ยังไม่ได้ทำการระเหยแห้งมาวิเคราะห์ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส พบว่าค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ในผลห่ามและผลสุกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลแสดงดังตารางที่ 3 โดยพบว่าในสารสกัดน้ำของผลสุกมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสใกล้เคียงกับผลห่าม ส่วนในกรณีสารสกัดเอทานอลผลสุกมีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อยกว่าผลห่าม และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลายน้ำกับเอทานอล สารสกัดเอทานอลให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสมากกว่าสกัดน้ำทั้งในผลห่ามและผลสุก




**รูปที่ 2** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสและความเข้มข้นของสารมาตรฐานอัลโลพิวรินอล




**รูปที่ 3** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสและความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

**ตารางที่ 3** ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

| ตัวทำละลาย | ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) | |
|---|---|---|
| | ผลห่าม | ผลสุก |
| น้ำ | 11.36 ± 0.01 | 12.03 ± 2.45 |
| เอทานอล | 62.43 ± 4.78 | 54.23 ± 2.77 |

จากผลการทดลองที่ได้อาจมาจากสภาพขั้วของตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดต่างกัน น้ำจะมีขั้วสูงกว่าเอทา-นอลจึงสกัดสารที่มีขั้วสูงกว่าออกมา ส่วนสารที่ถูกสกัดออกมาในตัวทำละลายเอทานอลจะเป็นกลุ่มที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารที่ถูกสกัดออกมาในสภาพขั้วใกล้เคียงกับเอทานอลให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ แซนทีนออกซิเดสได้ดีกว่าสารที่ถูกสกัดออกมาในน้ำ และจากผลดังกล่าวจึงได้ทำการหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 6.25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดเอทานอลจากผลห่ามและผลสุก (รูปที่ 3) ซึ่งหาค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 หรือ $IC_{50}$ ได้เท่ากับ 40.9 ± 2.5 และ 49.0 ± 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

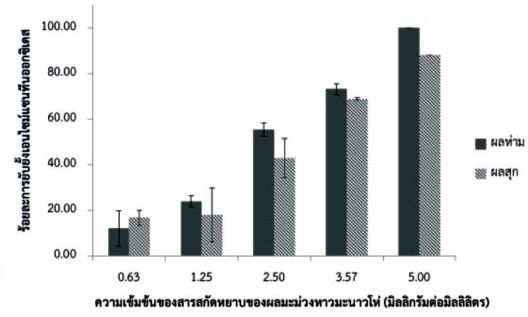
จากรูปที่ 3 พบว่าที่ทุกความเข้มข้นของผลสุกจะให้ค่าร้อยละการยับยั้งน้อยกว่าผลห่าม อาจกล่าวได้ว่ามีสารออกฤทธิ์บางส่วนหายไปเมื่อมะม่วงหาวมะนาวโห่เข้าสู่ระยะสุก จึงทำให้ในผลสุกที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสลดลง และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างพฤกษเคมีและร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์ในกรณีสารฟีนอลิกที่พบได้ในผลห่ามและสุก ได้มีรายงานวิจัยที่ศึกษาระยะการสุกต่อปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด พบว่าผลในระยะสุกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 40 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าในระยะผลห่ามและดิบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกัน ซึ่งเมื่อดูผลการยับยั้งเอนไซม์ในรูปที่ 3 จะเห็นว่าร้อยละการยับยั้งกลับลดลงในผลระยะสุก จึงเป็นไปได้ว่าสารกลุ่มฟีนอลิกอาจไม่ใช่สารกลุ่มหลักที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิ-เดสในสารสกัดหยาบมะม่วงหาวมะนาวโห่ [2] ดังนั้นสารที่มีความสำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์อาจจะเป็นสารกลุ่มอื่น เช่น ซาโปนิน เนื่องจากผลการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นพบซาโปนินแค่ในผลห่ามแต่ไม่พบในผลสุกซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการแยกสารประกอบกลุ่มซาโปนินออกมาได้ 4 ชนิด จากรากของพืช *Ilex pubescens* ที่พบในประเทศจีน โดยทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ดี [20]

อย่างไรก็ตามข้อมูลดังที่กล่าวมาเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้น สารสำคัญที่ยับยั้งเอนไซม์อาจจะเป็นสารกลุ่มอื่นซึ่งต้องทำการศึกษาให้ละเอียดลงไป

### 3.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิ-เดสของสารสกัดหยาบเอทานอลพบว่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่ได้ในผลห่ามและผลสุกให้ผลใกล้เคียงกัน โดยในผลห่ามจะให้ร้อยละการยับยั้งมากกว่าเล็กน้อยในเกือบทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ แสดงผลดังรูปที่ 4 ซึ่งเมื่อนำมาหาค่า $IC_{50}$ ได้ผลเท่ากับ 2.4 ± 0.05 และ 2.87 ± 0.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดหยาบของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มาเปรียบเทียบกับค่า $IC_{50}$ ของอัลโลพิวริ-นอล (จากหัวข้อที่ 3.2) พบว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบมีฤทธิ์การยับยั้งน้อยกว่าประมาณ 3,000 เท่า เนื่องจากสารสกัดหยาบประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ ที่อาจมีทั้งสารที่ยับยั้งและไม่ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และเมื่อเปรียบเทียบค่า $IC_{50}$ ของพืชชนิดอื่น ๆ กับผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ (ตารางที่ 4) จะเห็นว่าพืชแต่ละชนิดให้ประสิทธิภาพการยับยั้งแตกต่างกันออกไปและให้ผลที่ดีกว่ามะม่วงหาวมะนาวโห่ เช่น ส่วนหัวของหญ้าแห้วหมู (*Cyperusrotundus*L.) ที่สกัดด้วยเอทานอลให้ค่า $IC_{50}$ อยู่ที่ 0.0451 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนใบของมะละกอ (*Carica papaya*) ที่สกัดด้วยน้ำ ให้ค่า $IC_{50}$ อยู่ที่ 0.00433 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นต้น และเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับพืชในวงศ์เดียวกัน เช่น รากของ *Carissa opaca* ใบและต้น *Nerium oleander* L. (ยี่โถ) ให้ค่า $IC_{50}$ อยู่ที่ 0.156 และ 0.218 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่าการยับยั้งที่ดีกว่าประมาณ 10 เท่า




**รูปที่ 4** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสและความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองต่าง ๆ ที่ได้มานั้นมาจากการทดสอบด้วยสภาวะการทดลอง ตัวทำละลายและวิธีการสกัดต่างกัน ดังนั้นถึงแม้มะม่วงหาวมะนาวโห่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์แซน-ทีนออกซิเดสน้อยกว่าพืชอื่น ๆ และน้อยกว่าอัลโลพิวริ-นอล แต่ยังถือว่ามีความน่าสนใจในการศึกษาต่อไป เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิ-เดสของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ยังมีรายงานอยู่น้อยมากจึงอาจต้องทำการศึกษาต่อโดยทำการแยกสารสกัดที่ได้ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วทำให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อหาเฉพาะสารสำคัญที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสมากที่สุดสำหรับการพัฒนาผลมะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ที่มีประสิทธิภาพสูง

## 4. สรุป

พฤกษเคมีของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะผลห่ามที่ตรวจพบ คือ สารประกอบฟีนอลิก แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี ส่วนในระยะผลสุกพบองค์ประกอบใกล้เคียงกันแต่ไม่พบซาโปนิน ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส พบว่าสารสกัดเอทานอลให้ค่าร้อยละการยับยั้งที่สูงกว่าสารสกัดน้ำ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีน-

ออกซิเดสของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะห่ามและสุกพบว่าผลห่ามให้ผลการยับยั้งที่สูงกว่าผลสุกเล็กน้อยแต่เมื่อเปรียบเทียบกับอัลโลพิวรินอลยังมีฤทธิ์ต่ำกว่ามาก อย่างไรก็ตามผลจากงานวิจัยนี้ได้ช่วยยืนยันให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่สามารถยับยั้งเอนไซม์แซนทีน-ออกซิเดสซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดกรดยูริกที่ทำให้เกิดโรคเกาต์ได้ การทำให้สารสกัดหยาบมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยแยกสารที่ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งออก อาจจะช่วยให้ฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนามะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นยาสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับการรักษาโรคเกาต์ในอนาคตได้

**ตารางที่ 4** การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดจากตัวอย่างพืชชนิดอื่น ๆ

| พืช | วงศ์ | ส่วนที่ใช้ | ตัวทำละลาย | $IC_{50}$ (มก./มล.) | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|
| *Carica papaya* | Caricaceae | ใบ | น้ำ | 0.00433 | [14] |
| *Cyperusrotundus* L. | Cyperaceae | หัว | เอทานอล | 0.0451 | [21] |
| *Allium cepa* L. | Amaryllidaceae | หัว | เมทานอล | 0.013 | [22] |
| *Arctium minus* | Asteraceae | เมล็ด | เอทานอล | 0.117 | [23] |
| *Broussonetiapapyrifera* | Moraceae | ราก | เอทานอล | 0.0134 | [24] |
| *Ulmuscampestris* | Ulmaceae | เปลือก | เอทานอล | 0.285 | [25] |
| *Rhaponticumacaule* (L) DC | Compositae | ดอก | น้ำ | 0.0022 | [26] |
| *Aster glehni* | Compositae | ใบ | เอทานอล | 0.646 | [27] |
| *Nerium oleander* L. | Apocynaceae | ใบและลำต้น | เมทานอล | 0.218 | [28] |
| *Plumeria rubra* L. | Apocynaceae | ดอก | เมทานอล | 0.0239 | [29] |
| *Carissa opaca* | Apocynaceae | ราก | เมทานอล | 0.156 | [30] |
| *Carissa carandas* L. | Apocynaceae | ผลดิบ | เอทานอล | 2.40 | This work |
| | | ผลสุก | | 2.87 | |

## 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ จนเสร็จสมบูรณ์

## 6. เอกสารอ้างอิง

[1] P. Siritrakulsak, C. Ounmahong, S. Simla, B. Kunlanit and S. Benchasri, “Storage life extension of Karandas (*Carissa carandas* L.) Fruits,” *Songklanakarin Journal of Plant Science*, vol. 3, pp. 33-39, 2016.

[2] V. Devmurari, P. Shivanand and N.P. Jivani, “A review on Carissa congesta:

phytochemical constituents, traditional use and pharmacological properties," *International Journal of Chemical Sciences*, vol. 8, pp. 81-87, 2010.

[3] W. Pewlong, S. Sajjabut, S. Singphet and J. Eamsiri, "Influence of fruit ripening stages on the bioactive compounds of *Carissa carandas*," *Agricultural Science Journal*, vol. 44, pp. 337-340, 2013.

[4] R. Sharma, G.D. Reddy, A. Kaushik, K. Shanker, R.K. Tiwari, A. Mukherjee and Ch.V. Rao, "Analgesic and anti-inflammatory activity of *Carissa carandas* linn fruits and *Microstylis wallichii* Lindl tubers," *Natural Product Science*, vol. 13, pp. 6-10, Mar. 2017.

[5] V.H. Bhaskar and N. Balakrishnan, "Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Pergularia daemia* and *Carissa carandas*," *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 17, pp. 168-174, Mar. 2009.

[6] S. Sumbul and S.I. Ahmed, "Anti-hyperlipidemic activity of *Carissa carandas* (Auct.) leaves extract in egg yolk induced hyperlipidemic rats," *Journal of Basic and Applied Sciences,* vol. 8, pp. 124-134, 2012.

[7] S. Begum, S.A. Syed, B.S. Siddiqui, S.A. Sattar and M.I. Choudhary, "Carandinol: First isohopane triterpene from the leaves of *Carissa carandas* L. and itscytotoxicity against cancer cell lines," *Phytochemistry Letters*, vol. 6, pp. 91-95, 2013.

[8] M.R. Islam, S.M. Rahman, M. Ahmed, P.R. Das, M.T. Islam, M.H. Kabir, I. Ahmad and M. Rahmatullah, "Antinoci-ceptive activity studies with methanol extract of *Annona reticulata* L. (Annonaceae) and *Carissa carandas* L. (Apocynaceae) leaves in Swiss albino mice," *Advances in Natural and Applied Sciences*, vol. 6, pp. 1313-1318, 2012.

[9] P.R. Itankar, S.J. Lokhande, P.R. Verma, S.K. Arora, R.A. Sahu and A.T. Patil, "Antidiabetic potential of unripe *Carissa carandas* Linn. fruit extract," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, pp. 430-433, Mar. 2011.

[10] G. Ragab, M. Elshahaly and T. Bardin, "Gout: An old disease in new perspective -A review," *Journal of Advanced Research*, vol. 8, pp. 495-511, May. 2017.

[11] P. Pacher, A. Nivorozhkin and C. Szabo, "Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: Renaissance half a century after the discovery of allopurinol," *Pharmacological Reviews*, vol. 58, pp. 87-114, Mar. 2006.

[12] P.L. Owen and T. Johns, "Xanthine oxidase inhibitory activity of north-eastern North American plant remedies used for gout," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 64, pp. 149-160, Feb. 1999.

[13] L.D. Kong, Y. Cai, W.W. Huang, C.H.K. Cheng and R.X. Tan, "Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinalplants used to treat gout," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 73,

pp. 199-207, June. 2000.

[14] S.M.N. Azmi, P. Jamal and A. Amid, "Xanthine oxidase inhibitory activity from potential Malaysian medicinal plant as remedies for gout," *Inter-national Food Research Journal*, vol. 19, pp. 159-165, Jan. 2012.

[15] S. Suwancharoen, A. Boonmee, P. Arsakhant, P. Phitpoomsakul, R. Ponard and Teerapich Kasemsuk, "Phytochemical and Larvicidal Activity Against *Culex sp. of Nerium oleander* L. (Pink cultivar) Flowers and Leaves Extracts," *Khon Kean University Science Journal*, vol. 45, pp. 521-530, 2017.

[16] G.A. Ayoola, H.A.B. Coker, S.A. Adesegun, A.A. Adepoju-Bello, K. Obaweya, E.C. Ezennia and T.O. Atangbayila, "Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for Malaria therapy in Southwestern Nigeria," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 7, pp. 1019-1024, Sep. 2008.

[17] N.V. Sithara, S. Komathi, G. Rajalakshmi, J. Queen and D. Bharathi, "Phytochemical analysis of *Andrographis Paniculata* using different solvents" *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, vol. 4, pp. 28-30, Aug. 2016.

[18] S. Simla, S. Boontang and P. Siritrakulsak, "The evaluation of some phytochemical content and antioxi-dant activity in *Carissa carandas* L.," *KhonKaen Agriculture Journal*, vol. 41, pp. 602-606, 2013.

[19] C. Kankamol, "Free radical scavenging capacity, tyrosinase inhibition activity and total phenolic compound of extracts from *Carissa carandas* L. fruit," in *Proceeding of 4th SuanSunandha Academic National Conference on "Research for Sustainable Development"*, Suan Sunandha Rajabhat University, Thailand, 2016, pp. 225-234.

[20] L.P. Lin, W. Qu and J.Y. Liang, "Triterpene saponins with XOD inhibi-tory activity from the roots of *Ilexpubescens,*" *Chinese Chemical Letters*, vol. 22, pp. 697-700, 2011.

[21] Y. Pongpiriyadacha, P. Nuansrithong and N. Sirintharawech, "Antioxidant activity and xanthine oxidase inhibitor from Thai medicinal plants used for tonic and longevity," in *Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Science*, Kasetsart Univer-sity, Thailand, 2009, pp. 94-102.

[22] J. Hanaee, M. Rashidi, A. Delazar and S. Piroozpanah, "Onion, a potent inhibitor of xantine oxidase," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 4, pp. 243-247, Oct. 2004.

[23] S.P.M. Fischer, I. Brusco, C. Campono-gara, M. Piana, H. Faccin, L.A. Gobo, L.M. Carvalho and S.M. Oliveira, "*Arctium minus* crude extract presents antinociceptive effectin a mice acute gout attack model," *Inflammopharmacol*, vol. 26, pp. 505-519, 2018.

[24] H.W. Ryu, J.H. Lee, J.E. Kang, Y.M. Jin and K.H. Park, "Inhibition of Xanthine

oxidase by phenolic phytochemicals from *Broussonetiapapyrifera,*" *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, vol. 55, pp. 587-594, Oct. 2012.

[25] H. Boudaoud-Ouahmed, S. Tiab, N. Saidani, M. Gherrou, K. Ziane and D. Atmani, "Phytochemical screening and pharma-cological activities of *Ulmuscampestris* bark extracts," *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, vol. 15, pp. 353-363, Nov. 2015.

[26] H. Mosbah, H. Chahdoura, J. Kammoun, M.B. Hlila, H. Louati, S. Hammami, G. Flamini, L. Achour and B. Selmi, "*Rhaponticumacaule* (L) DC essential oil : chemical composition, *in vitro* antioxidant and enzyme inhibition properties," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 18, pp. 79-90, Mar. 2018.

[27] E.H. Han, M.K. Lim, S.H. Lee, H.J. Kim and D. Hwang, "Synergic effect in the reduction of serum uric acid level between ethanol extract of *Aster glehni* and vitamin $B_6$," *Food Science and Biotechnology*, vol. 27, pp. 1439-1444, Jun. 2018.

[28] W.Y. Huang, Y.Z. Cai, K.D. Hyde, H. Corke and M. Sun, "Endophytic fungi from *Nerium oleander L*. (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, pp. 1253-1263, Aug. 2007.

[29] S.S.P.M. Isa, A. Ablat and J. Mohamad, "The antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *Plumeria rubra* Flowers," *Molecules*, vol. 23, pp. 1-18, Feb. 2018.

[30] R. Saeed and D. Ahmed, "Bioactive compounds from *Carissa opaca* roots and xanthine oxidase and alpha-amylase inhibitory activities of their methanolic extract and its fractions in different solvents," *Pharmacognosy Research*, vol. 7, pp. 295-301, Oct. 2015.