



<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/index>

บทความวิจัย

ผลของสารสกัดจากพริกต่อคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

สุวัชชัย มิสุนา* นирมล ศรีชนะ กิตติพงษ์ ชูจิตร และ วิมลนันท์ พงศ์ภัทรกานต์

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย อำเภอเมืองเลย จังหวัดเลย 42000

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 28 มิถุนายน 2566

แก้ไข: 23 กรกฎาคม 2566

ตอบรับการตีพิมพ์: 23 สิงหาคม 2566

ตีพิมพ์ออนไลน์: 19 ตุลาคม 2566

คำสำคัญ

พริก

แซนทีนออกซิเดส

อัลโลฟูรินอล

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

บทคัดย่อ

เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนอนุพันธ์ของเบสพิวรีนให้เป็นกรดยูริก ปริมาณกรดยูริกที่สูงกว่าปกติทำให้เกิดการตกตะกอนของผลึกเกลือโมโนโซเดียมยูเรตบริเวณข้อและรอบ ๆ ข้อของร่างกายจนทำให้เกิดการอักเสบ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสด้วยสารสกัดจากพริก 5 ชนิด ได้แก่ พริกขี้หนูสวน พริกขี้หนู พริกส้ม พริกขี้ฟ้า และพริกหวาน โดยใช้เอทานอลและอะซีโตนไตรเอทิลเป็นตัวทำละลาย สารสกัดที่ได้นำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยตรงด้วยวิธีทางสเปกโทรโฟโตเมทรี เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแคปไซซินและอัลโลฟูรินอล จากการทดลองพบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จากพริก 5 ชนิดอยู่ในช่วงร้อยละ 5.49-17.75 และ 1.55-7.62 โดยน้ำหนักเมื่อใช้เอทานอลและอะซีโตนไตรเอทิลเป็นตัวทำละลายตามลำดับ ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากสารสกัดของพริกทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดด้วยอะซีโตนไตรเอทิลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) อยู่ในช่วง 5.36-34.86 และ 28.76-87.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อใช้ อะซีโตนไตรเอทิลและเอทานอลเป็นตัวทำละลายตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยอะซีโตนไตรเอทิลจากพริกขี้หนูและพริกขี้หนูสวนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ไม่ต่างกับสารมาตรฐานแคปไซซิน (4.02±0.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และอัลโลฟูรินอล (3.13±0.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วย อะซีโตนไตรเอทิลของพริกขี้หนูและพริกขี้หนูสวนมีศักยภาพในการเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้

บทนำ

กรดยูริก (Uric acid) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเกิดออกซิเดชันของเบสพิวรีนในวิถีแคแทบอลิซึมโดยเอนไซม์ แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase) ปริมาณกรดยูริกที่ถูกผลิตในร่างกายมากเกินไปหรือร่างกายกำจัดกรดยูริกน้อยเกินไปส่งผลให้ระดับกรดยูริกในเลือดสูงขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคเก๊าท์ (Galassi & Borghi, 2015) เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราเร็วของการสังเคราะห์กรดยูริกในวิถีแคแทบอลิซึมของเบสพิวรีนโดยเข้าไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสองขั้นตอนสุดท้ายที่เปลี่ยนไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) และแซนทีน (Xanthine) ให้ได้เป็นกรดยูริกซึ่งมีนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) และแก๊สออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Battelli et al., 2014) นอกจากกรดยูริกที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์แล้วยังพบว่ามีอนุมูลอิสระในกลุ่มของออกซิเจนอะตอม (Reactive oxygen species) เกิดขึ้นด้วย เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Chen et al., 2016) อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดทางออกซิเดชัน (Oxidative stress) ต่อสารชีวโมเลกุล อาทิ โปรตีน ลิพิด คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ มีรายงานว่าการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

ที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิด อนุมูลอิสระมากขึ้นและมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่าง ๆ ทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง เช่น ความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดจะเพิ่มร้อยละ 15 เมื่อมีปริมาณของกรดยูริกในเลือด 1 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (Borghi & Desideri, 2016; Minhas et al., 2006)

โดยปกติสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุนัขและแมว จะมีระบบการกำจัดกรดยูริกออกจากร่างกายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ยูเรตออกซิเดส (Urate oxidase) หรือยูริเคส (Uricase) โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะสลายกรดยูริกที่อยู่ในรูปผลึกให้ได้รูปที่ละลายน้ำได้และถูกกำจัดออกนอกร่างกายของสัตว์ในรูปของปัสสาวะ (MacWilliams & Friedrichs, 2003; Nuki & Simkin, 2006) เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่าพบอุบัติการณ์การเกิดโรคเก๊าท์ในสุนัขจำนวน 4 ตัว และแมว 1 ตัว โดยพบการสะสมของกรดยูริกบริเวณน้ำไขข้อของสัตว์ (Kim et al., 2022) เมื่อทำการรักษาโดยให้สุนัขสองตัวได้รับยาเคมีคุ้มกัน พบว่าหนึ่งในสองมีอาการของโรคกำเริบส่วนอีกหนึ่งตัวอาการของโรคหายไปเป็นเวลา 3 เดือน (Kim et al., 2022) เมื่อทำการรักษาโดยให้ยาเคมีคุ้มกันร่วมกับตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสพบว่าสุนัขตายหลังจากการได้รับยา 3 สัปดาห์ (Kim et al., 2022) ในขณะที่สุนัขที่ได้รับยาลดการอักเสบร่วมกับตัวยับยั้งการทำงานของ

*Corresponding author

E-mail address: suwachai.mis@lru.ac.th (S. Misuna)

Online print: 19 October 2023 Copyright © 2023. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2023.23>

เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส อาการของโรคหายไปเป็นเวลา 3 ปี (Kim et al., 2022) สำหรับการรักษาในแมวพบอาการของโรคจะกำเริบภายใน 6 เดือนหลังจากที่ได้รับยาต้านการอักเสบร่วมกับการใช้ด็อกซ์โทรมีทาโซน (Dexamethasone) (Kim et al., 2022)

อัลโลพิวรีนอล (Allopurinol) หรือ 4-(Hydroxypyrazolo (3, 4-d) pyrimidine) เป็นยาที่ใช้รักษาโรคกรดยูริกในกระแสเลือด โดยกลไกการทำงานของอัลโลพิวรีนอลพบว่าหลังจากที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกไฮโดรไลต์เป็นออกซีพิวรีนอล (Oxypurinol) ออกซีพิวรีนอลที่ได้จะเข้าไปยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสป้องกันการเปลี่ยนไฮโปแซนทีนไปเป็นแซนทีนและแซนทีนไปเป็นกรดยูริกส่งผลให้ระดับกรดยูริกในกระแสเลือดลดลง (Okamoto et al., 2008) แต่มีรายงานว่าการใช้อัลโลพิวรีนอลติดต่อกันเป็นเวลาดั้งแต่ 1 เดือนขึ้นไปมีโอกาสทำให้ผู้ใช้เกิดภาวะภูมิไวเกิน (Hypersensitivity) (Min et al., 2015) สำหรับ ฟีบักโซสแตต (Febuxostat) หรือ 2-(3-Cyano-4-isobutoxy-phenyl)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid เป็นยาอีกชนิดหนึ่งที่ใช้กับผู้ป่วยบางรายที่ร่างกายไม่ตอบสนองต่อการใช้อัลโลพิวรีนอล (Hassan et al., 2011) จากรายงานการศึกษาทางคลินิกพบว่าฟีบักโซสแตตสามารถลดระดับกรดยูริกในกระแสเลือดได้ดีกว่าและมีความเป็นพิษน้อยกว่าอัลโลพิวรีนอล (Chohan, 2011) แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่าร้อยละ 2 ของผู้ใช้ฟีบักโซสแตตเกิดอาการข้างเคียงทางผิวหนัง (Abeles, 2012) และมีโอกาสทำให้ผู้ใช้เกิดภาวะกล้ามเนื้อสลาย (Kang et al., 2014) จากข้อมูลดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสตัวใหม่ที่ไม่มียาข้างเคียงหรือมีความรุนแรงต่อผู้ใช้น้อยกว่าอัลโลพิวรีนอลและฟีบักโซสแตต

มีรายงานว่าสารพฤกษเคมีจากธรรมชาติ เช่น ริพาร์ซาโปนิน (Riparsaponin) เจนิสทิน (Genistin) มอร์อิน (Morin) และเคอร์คูมิน (Curcumin) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ในหลอดทดลอง (Chen et al., 2016) ฟิชและสมุนไพบบางชนิดที่มีอนุพันธ์ของโปรโตคาเทคฮัลดีไฮด์ (Protocatechuic aldehyde) เช่น 3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNb) เป็นส่วนประกอบยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลอง (Lü et al., 2013) หรือส่วนของสารสกัดด้วยเมทานอลจากใบหนาด (*Blumea balsamifera*) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ถึงร้อยละ 79.67 โดยสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) แทนนิน (Tannins) และเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) (Apaya & Hernandez, 2011)

พริกเป็นพืชในวงศ์ Solanaceae สกุล Capsicum ในประเทศไทยนำพริกมาใช้เป็นเครื่องเทศเพื่อปรุงอาหารหรือนำมาบริโภคโดยตรง รสชาติที่เผ็ดร้อนของพริกเป็นผลมาจากสารประกอบในกลุ่มแคปไซซินอยด์ (Capsaicinoids) เช่น แคปไซซิน (Capsaicin) ไดไฮโดรแคปไซซิน (Dihydrocapsaicin) และนอร์ไดไฮโดรแคปไซซิน (Nordihydrocapsaicin) ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ใน พริกแต่ละชนิดมีปริมาณแคปไซซินเป็นองค์ประกอบมากที่สุดรองลงมาคือ ไดไฮโดรแคปไซซินและ นอร์ไดไฮโดรแคปไซซินตามลำดับ (Inprasit et al., 2022) มีรายงานว่าแคปไซซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α -Amylase) เอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดส (α -Glucosidase) (Barajas et al., 2021) นอกจากนี้ยังพบว่าแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินที่สกัดแยกได้จากขิง (*Zingiber officinalae*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ดีกว่าอัลโลพิวรีนอลอีกด้วย (Muthusamy & Jeyabalan, 2019)

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากพริก 5 ชนิด ได้แก่ พริกขี้หนูสวน (*Capsicum frutescens*) พริกขี้หนู (*Capsicum annuum* L.) พริกส้ม (*Capsicum* spp.) พริกขี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh) และพริกหวาน (*Capsicum annuum* Linn.) ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่เป็นเอนไซม์ในการเพิ่มปริมาณกรดยูริกในกระแสเลือด ผลงานวิจัยที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการหาสารพฤกษเคมีจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสและไม่มีผลข้างเคียงหรือมีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้น้อย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างพริกที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ พริกขี้หนูสวน พริกขี้หนู พริกส้ม พริกขี้ฟ้าและพริกหวาน (Figure 1) ทำการเก็บตัวอย่างพริกทั้ง 5 ชนิดในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2561 โดยพริกขี้หนูสวน พริกขี้หนู และพริกส้ม เก็บจากตำบลนาดินดำ อำเภอเมือง จังหวัดเลย พริกขี้ฟ้าและพริกหวานเลือกซื้อจากตลาดสดนาอ้อของจังหวัดเลย นำตัวอย่างพริกมาล้างให้สะอาดแล้วผึ่งลมให้แห้งก่อนจะนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดพริกให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่นบดละเอียดยี่ห้อ Nine Blue รุ่น 2500A ที่ความเร็วรอบ 32,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บตัวอย่างพริกที่บดละเอียดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือนำไปทำการทดลองในขั้นถัดไป

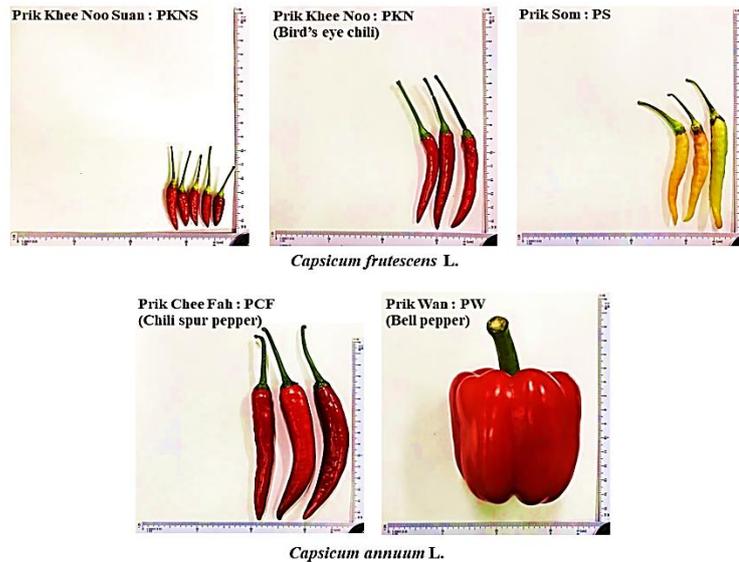


Figure 1 The morphological of five chili peppers in experiment.

การเตรียมสารสกัด

1. สารสกัดด้วยเอทานอล (Ethanol extracts)

ชั่งตัวอย่างพริกมา 10 กรัม สกัดในเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ระยะเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดยกวนตลอดเวลา กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส คำนวณปริมาณสารสกัดที่ได้และนำสารสกัดไปทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

2. สารสกัดด้วยอะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile extracts)

ชั่งตัวอย่างพริกมา 5 กรัม สกัดในอะซิโตนไนไตรล์บริสุทธิ์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ระยะเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องโดยกวนตลอดเวลา กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส คำนวณปริมาณสารสกัดที่ได้และนำสารสกัดไปทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดจากพริก ในระดับหลอดทดลอง (in vitro)

1. ขั้นตอนทดสอบการยับยั้งเอนไซม์จากสารสกัด (Inhibition test)

การทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดจากพริกทำได้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Owen & Johns (1999) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารสกัดของพริกแต่ละชนิดโดยเจือจางด้วยตัวทำละลายให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดมา 10 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่เข้มข้น 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมแซนทีน (สารตั้งต้นของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส) เข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ 1.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Shimadzu - 160 A ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ในการทดลองใช้แคปไซซินเป็นสารมาตรฐานและอัลโลฟูรินอลเป็นสารที่ให้ผลบวก (Positive control) แล้วคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (% Inhibition)

2. ขั้นตอนทดสอบการรบกวนจากสารสกัด (Interference test)

การทดลองในขั้นตอนนี้ทำการทดลองเหมือนกับในข้อ 1 แต่ไม่มีการเติมเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสลงในชุดการทดลอง ตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นโดยนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (% Inhibition) ได้จากสูตรด้านล่าง

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D)}{A-B} \times 100$$

โดยที่ A คือค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองที่ไม่มีสารสกัด ในขั้นตอนการยับยั้งเอนไซม์
B คือค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองที่มีสารสกัด ในขั้นตอนการยับยั้งเอนไซม์
C คือค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองที่มีเอนไซม์ ในขั้นตอนการรบกวนจากสารสกัด
D คือค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองที่ไม่มีเอนไซม์ ในขั้นตอนการรบกวนจากสารสกัด

นำค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสไปหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (50 % Inhibition concentration, IC₅₀) โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แกน X) และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (แกน Y)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (Technical replicates) หาค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

สารประกอบในกลุ่มแคปไซซินอยด์ที่พบในพริกสามารถสกัดออกมาได้โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล เมทานอล อะซิโตนและอะซิโตนไตรล ออย่างใดก็ตามประสิทธิภาพในการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณของแคปไซซินอยด์มากที่สุดต้องพิจารณาถึงส่วนต่าง ๆ ของพริกที่นำมาใช้ในการสกัด เช่น เนื้อเยื่อชั้นนอกและเนื้อเยื่อชั้นกลางของพริกจะมีปริมาณแคปไซซินอยด์น้อยกว่าเนื้อเยื่อชั้นใน แกนกลางและเมล็ดของพริก (Chinn et al., 2011) นอกจากนี้การเลือกตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยต่อการนำแคปไซซินอยด์ไปประยุกต์ใช้ก็ควรนำมาพิจารณาเช่นเดียวกัน เช่น การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายจะปลอดภัยกว่าการใช้อะซิโตนแต่จะได้ปริมาณของแคปไซซินอยด์น้อยกว่าการใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย (Kruawan et al., 2022) และยังมีรายงานว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการสกัดแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินจากพริกคือการใช้อะซิโตนไตรลเป็นตัวทำละลายรองลงมาคือเอทานอล (Chinn et al., 2011) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้เอทานอลและอะซิโตนไตรลเป็นตัวทำละลายสารประกอบในกลุ่มแคปไซซินอยด์ออกจากพริกทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองพบว่าเมื่อสกัดพริกทั้ง 5 ชนิดโดยใช้เอทานอลและอะซิโตนไตรลเป็นตัวทำละลาย พบปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงร้อยละ 5.49-17.75 และ 1.55-7.62 ตามลำดับ (Table 1) โดยที่พริกหวานให้ปริมาณของสารสกัดด้วยเอทานอลมากที่สุดร้อยละ 17.75±0.22 ส่วนพริกขี้หนูสวน พริกขี้หนูและพริกส้มให้ปริมาณของสารสกัดไม่แตกต่างกันเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย (Table 1) ในขณะที่เมื่อใช้อะซิโตนไตรลเป็นตัวทำละลายพบว่าพริกขี้หนูให้ปริมาณของสารสกัดสูง

ที่สุดคือร้อยละ 7.62±0.06 ในขณะที่พริกหวานจะได้ปริมาณของสารสกัดน้อยที่สุด (Table 1)

อัลโลพูรินอลเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส โดยอัลโลพูรินอลจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในขั้นการเปลี่ยนไฮโปแซนทีนไปเป็นแซนทีนและแซนทีนไปเป็นกรดยูริกส่งผลให้ระดับกรดยูริกในเลือดลดลง (Okamoto et al., 2008) ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีน ออกซิเดสจากสารสกัดของพริกทั้ง 5 ชนิด โดยใช้อัลโลพูรินอลเป็นสารที่ให้ผลบวกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแคปไซซิน สารสกัดด้วยเอทานอลและสารสกัดด้วยอะซิโตนไตรลจากพริกทั้ง 5 ชนิด พบว่าเมื่อใช้เมื่อความเข้มข้นของอัลโลพูรินอลและแคปไซซินในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจะสูงขึ้น (Figure 2A-2B) สำหรับสารสกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตนไตรลพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากพริกทั้ง 5 ชนิดสูงขึ้นความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสก็เพิ่มขึ้นด้วย (Figure 2C-2D) แต่สารสกัดด้วยอะซิโตนไตรลจะมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลเมื่อใช้ความเข้มข้นที่เท่ากัน (Figure 2C-2D)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในค่าของความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (50 % Inhibition concentration, IC₅₀) ให้ผลดัง Table 2 พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากพริกทั้ง 5 ชนิด ให้ค่า IC₅₀ ที่สูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัลโลพูรินอลและแคปไซซิน (Table 2) ในทางตรงกันข้ามสารสกัดด้วยอะซิโตนไตรลจากพริกขี้หนูสวนและพริกขี้หนูให้ค่า IC₅₀ ที่ไม่แตกต่างกับอัลโลพูรินอล และแคปไซซิน (Table 2) แสดงว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนไตรลจากพริกขี้หนูสวนและพริกขี้หนูมีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ใกล้เคียงกับอัลโลพูรินอลและแคปไซซิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนไตรลจากพริกส้มและพริกขี้ฟ้าให้ค่า IC₅₀ ที่ต่ำ (Table 2) แม้จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัลโลพูรินอลและแคปไซซินก็ตาม (Table 2)

Table 1 Extraction yields of five chili pepper

Sample	Sample code	Extraction yield (g/100g of dry sample)	
		Ethanolic extract	Acetonitrile extract
Prik Khee Noo Suan	PKNS	5.49±0.28 ^a	6.34±0.17 ^a
Prik Khee Noo	PKN	7.79±0.11 ^a	7.62±0.06 ^a
Prik Som	PS	8.40±0.04 ^a	5.11±0.13 ^a
Prik Chee Fah	PCF	9.07±0.15 ^b	6.21±0.24 ^a
Prik Wan	PW	17.75±0.22 ^c	1.55±0.30 ^b

Values in the same column followed by a different letter (^{a-c}) are significantly different ($P < 0.05$). Each value in table is represented as mean±SD (n=3).

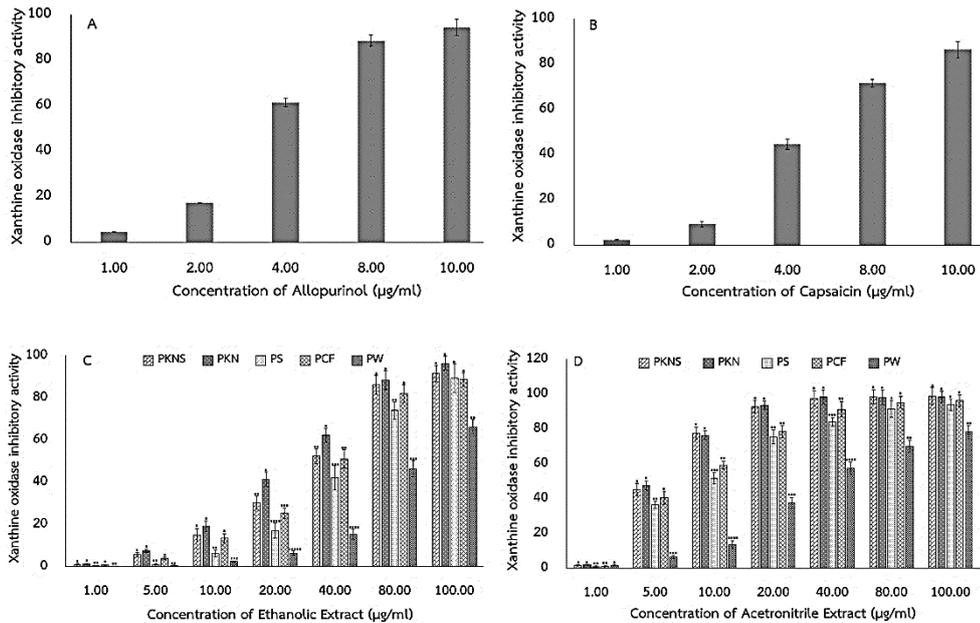


Figure 2 Effect of difference concentration from five chili pepper extract in xanthine oxidase inhibitory effect.

*, **, ***, ****, ***** Mean with different in same concentration are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2 Xanthine oxidase inhibitory activity of five chili pepper

Samples	50 % Inhibition Concentration (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	
	Ethanol extract	Acetonitrile extract
Prik Khee Noo Suan	30.50±0.45 ^b	5.61±0.10 ^a
Prik Khee Noo	28.76±0.63 ^b	5.36±0.06 ^a
Prik Som	46.33±2.60 ^c	8.41±0.69 ^b
Prik Chee Fah	34.05±1.18 ^b	7.18±0.17 ^b
Prik Wan	87.63±1.92 ^d	34.86±0.32 ^c
Capsaicin		4.02±0.14 ^a
Allopurinol		3.13±0.11 ^a

Values in the same column followed by a different letter (^{a-c}) are significantly different ($P < 0.05$). Each value in table is represented as mean \pm SD ($n=3$).

สารประกอบในกลุ่มแคปไซซินอยด์ที่พบในพริกมีหลายชนิด เช่น แคปไซซิน ไดไฮโดรแคปไซซิน นอร์ไดไฮโดรแคปไซซิน โฮโมแคปไซซินและโฮโมไดไฮโดรแคปไซซิน แต่ที่พบมากที่สุดมีเพียง 2 ชนิดคือ แคปไซซินร้อยละ 46-47 และไดไฮโดรแคปไซซินร้อยละ 22-40 โดยขึ้นอยู่กับชนิดของพริกแต่ละสายพันธุ์ Thongmarong & Phoomya (2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัดแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินให้ได้มากที่สุดคือใช้อะซิโตน ไตรลเป็นตัวทำละลาย (Chinn et al., 2011) จากการทดลองพบว่า สารมาตรฐานแคปไซซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ แชนทีนออกซิเดสเทียบเท่ากับอัลโลพูรินอล (Table 2) ซึ่งเมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของแคปไซซินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นส่วนประกอบอยู่บนวงแหวนเบนซีน (Figure 3) โดยมีรายงานว่าหมู่ไฮดรอกซิลมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แชนทีน

ออกซิเดสได้ดี โดยที่หมู่ไฮดรอกซิลจะถูกเติมลงในคาร์บอนของ แชนทีนที่ตำแหน่งที่ 2 และ 6 ซึ่งเป็นบริเวณเร่งต่อเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสทำให้เอนไซม์แชนทีนออกซิเดสไม่สามารถเปลี่ยนแชนทีนไป เป็นกรดยูริกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ (Khimkem & Khempaka, 2020) และจากรายงานการศึกษาในการจำลองการจับกัน (Molecular docking) ระหว่างแคปไซซิน ไดไฮโดรแคปไซซินและอัลโลพูรินอลกับ เอนไซม์แชนทีนออกซิเดสเมื่อใช้โปรแกรม Molegro Virtual Docker พบว่าแคปไซซิน ไดไฮโดรแคปไซซินและอัลโลพูรินอลเกิดอันตรกิริยาไฮโดรเจนกับเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสได้แตกต่างกัน โดยที่ไดไฮโดรแคปไซซินจะเกิดอันตรกิริยาไฮโดรเจนกับเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสได้ดีกว่าแคปไซซินและอัลโลพูรินอลตามลำดับ (Muthusamy & Jeyabalan, 2019)

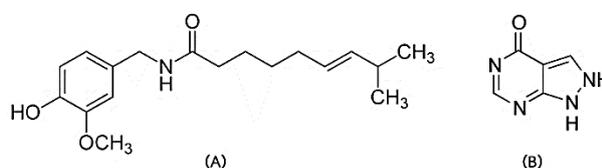


Figure 3 Structure of capsaicin (A) and allopurinol (B)

จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้เป็นการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสของสารสกัดหยาบจากพริก แต่ก็มีความน่าสนใจเนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดด้วยอะซีโตนไทรคลอโรเอทิลกับอัลโลพูรินอลพบว่าสารสกัดด้วยอะซีโตนไทรคลอโรเอทิลของพริกชี้หูสวนและพริกชี้หนุมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสได้ใกล้เคียงกัน (Table 2) นอกจากนี้ข้อมูลเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากพริกต่อการยับยั้งเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสยังมีรายงานอยู่น้อยมาก จึงอาจต้องทำการศึกษาต่อโดยการแยกสารสกัดหยาบให้ได้สารที่บริสุทธิ์สูงขึ้นเพื่อให้ได้สารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ แชนทีนออกซิเดสมากที่สุดสำหรับการพัฒนาสารสกัดจากพริกให้เป็นสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการลดการสะสมของกรดยูริกซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคเก๊าท์

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ นำพริกมา 5 ชนิด ได้แก่ พริกชี้หนุมสวน พริกชี้หนุม พริกส้ม พริกชี้ฟ้าและพริกหวานมาสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ส่งผลให้ปริมาณกรดยูริกในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นและส่งผลโดยตรงต่อคนที่เป็โรคเก๊าท์ ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดด้วยอะซีโตนไทรคลอโรเอทิลจากพริกชี้หนุมสวน พริกชี้หนุม พริกส้ม พริกชี้ฟ้ามีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับอัลโลพูรินอลและสามารถฐานแคปไซซิน ในขณะที่พริกหวานไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แชนทีนออกซิเดส ผลงานวิจัยที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำสารสกัดที่ได้ไปแยกบริสุทธิ์ให้ได้สารประกอบที่บริสุทธิ์สูงขึ้นแล้วตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แชนทีนออกซิเดสในระดับ *in vitro* หรือ *in vivo* ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ที่ได้ให้การสนับสนุน อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

References

Abeles, M. A. (2012). Febuxostat hypersensitivity. *The Journal of Rheumatology*, 39(3), 659.

Apaya, M. K., & Hernandez, C. (2011). Xanthine oxidase inhibition from selected Philippine plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2), 289-292.

Barajas E. M., Cantua, G. V. B., Morales, A. H., Pelayo, V. D. R. T., Martinez, J. V., & Cantua, N. E. B. (2021). In vitro α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition and antioxidant activity by capsaicin and piperine from *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits.

Journal of Environmental Science and Health, Part B, 56(3), 282-291. doi: 10.1080/03601234.2020.1869477

Battelli, M. G., Bolognesi, A., & Polito, L. (2014). Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 1842(9), 1502-1517.

Borghi, C., & Desideri, G. (2016). Urate-lowering drugs and prevention of cardiovascular disease: the emerging role of xanthine oxidase inhibition. *Hypertension*, 67(3), 496-498. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06531

Chen, C., Lu, J. M., & Yao, Q. (2016). Hyperuricemia-related diseases and xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors: An overview. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 2501-2512. doi: 10.12659/MSM.899852

Chinn, M. S., Shivappa, R. R. S., & Cotter, J. L. (2011). Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food and Bioprocess Technology*, 89(4), 340-345.

Chohan, S. (2011). Safety and efficacy of febuxostat treatment in subjects with gout and severe allopurinol adverse reactions. *The Journal of Rheumatology*, 38(9), 1957-1959. doi: 10.3899/jrheum.110092

Galassi, F. M., & Borghi, C. (2015). A brief history of uric acid: from gout to cardiovascular risk factor. *European Journal of Internal Medicine*, 26(5), 373. doi: 10.1016/j.ejim.2015.04.005

Hassan, S., Wetz, R., & Zouein, E. (2011). Allopurinol causing drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: a challenging diagnosis. *International Journal of General Medicine*, 4, 789-792. doi: 10.2147/IJGM.S24953

Inprasit, K., Chookaew, L., Suksawad, J., & Chuenwatthana, S. (2022). Physicochemical properties and capsaicinoids content of Thai chili cultivars used in southern sour curry paste (Kaeng Som). *Bulletin of Applied Sciences*, 11(11), 121-132.

Kang, Y., Kim, M. J., Jang, H. N., Bae, E. J., Yun, S., Cho, H. S., Chang, S. H., & Park, D. J. (2014). Rhabdomyolysis associated with initiation of febuxostat therapy for hyperuricemia in a patient with chronic kidney disease. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 39(3), 328-330. doi:10.1111/jcpt.12144

Khimkem, A., & Khempaka, S. (2020). Evaluation of phytochemical properties of *Sida acuta* Burm.f. and its dietary supplement effect on plasma purine, purine derivative and uric acid concentrations of Korat

- chickens. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 48(1), 143-152. doi:10.14456/kaj.2020.13 (in Thai)
- Kim, H. S., Hwang, H. J., Kim, H. J., & Do, S. H. (2022). Case report: Articular gout in four dogs and one cat. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 752774. doi: 10.3389/fvets.2022.752774
- Kruawan, S., Hanchaiyaphum, P., Sodawichit, S., Janthakhat, P., Konglamjeak, S., Khiewbanyang, N., Wutisart, T., & Phadungchob, B. (2022). Effect of extraction solvent on capsaicin content of chinda peppers. *Suan Sunandha Science and Technology Journal*, 9(2), 48-52.
- Lu, J. M., Yao, Q., & Chen, C. (2013). 3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNB) is a potent inhibitor of xanthine oxidase: a potential therapeutic agent for treatment of hyperuricemia and gout. *Biochemical Pharmacology*, 86(9), 1328-1,337. doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.011
- MacWilliams, P. S., & Friedrichs, K. R. (2003). Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 33(1), 153-178. doi: 10.1016/s0195-5616(02)00083-9
- Min, H. K., Lee, B., Kwok, S. K., Ju, J. H., Kim, W. U., Park, Y. M., & Park, S. H. (2015). Allopurinol hypersensitivity syndrome in patients with hematological malignancies: characteristics and clinical outcomes. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 30(4), 521-530. doi: 10.3904/kjim.2015.30.4.521
- Minhas, K. M., Saraiva, R. M., Schuleri, K. H., Lehrke, S., Zheng M., Saliaris A. P., Berry, C. E., Barouch, L. A., Vandegaer, K. M., Li, D., & Hare, J. M. (2006). Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Circulation Research*, 98(2), 271-279. doi:10.1161/01.RES.0000200181.59551.71
- Muthusamy, S., & Jeyabalan, S. (2019). In-silico and in-vitro evaluation of xanthine oxidase inhibition of Zingiber officinalae for hypouricemic activity. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(1), 314-320. doi: 10.5958/0974-360X.2019.00057.X
- Nuki, G., & Simkin, P. A. (2006). A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Research & Therapy*, 8(Suppl. 1), S1. doi:10.1186/ar1906
- Okamoto, K., Eger, B. T., Nishino, T., Pai, E. F., & Nishino, T. (2008). Mechanism of inhibition of xanthine oxidoreductase by allopurinol: Crystal structure of reduced bovine milk xanthine oxidoreductase bound with oxipurinol. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6-7), 888-893. doi: 10.1080/15257770802146577
- Owen, P. L., & Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(2), 149-160. doi: 10.1016/s0378-8741(98)00119-6
- Thongmarong, P., & Phoomya, P. (2017). Determination of capsaicin and antioxidant activity in spicy herbs. Proceedings of the 4th National conference (pp. 931-936). Kamphaeng Phet: Kamphaeng Phet Rajabhat University. (in Thai)

Research article

Inhibitory effect of chili pepper extracts on xanthine oxidase activity

Suwatchai Misuna* Niramol Srichana Kittipong Choojit and Wimonnann Pongpatrakant

*Program in Chemistry, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Mueang Loei, Loei, 42000***ARTICLE INFO****Article history**

Received: 28 June 2023

Revised: 23 July 2023

Accepted: 23 August 2023

Online published: 19 October 2023

Keyword*Chili pepper**Xanthine oxidase**Allopurinol**Inhibition of enzyme activity***ABSTRACT**

Xanthine oxidase enzyme plays a significant role in the change of purine base derivatives into uric acid. An excessive amount of uric acid leads to the formation of monosodium urate crystals in and around the joints of the human body, resulting in joint inflammation. The objective of this study was to investigate the potential of extracts from the five different chili peppers to inhibit the activity of xanthine oxidase enzyme. Five chili peppers (Prik Khee Noo Suan, Prik Khee Noo, Prik Som, Prik Chee Fah and Prik Wan) were extracted with absolute ethanol and acetonitrile. The extracts were evaluated for their potential to inhibit xanthine oxidase activity comparing them with standard capsaicin and allopurinol. The results of the experiment showed that the extract yield from five chili peppers ranged from 5.49-17.75 and 1.55-7.62 %w/w when using absolute ethanol and acetonitrile as the solvent, respectively. The results of the study on the inhibitory effect of chili extract on xanthine oxidase activity revealed that the acetonitrile extract was more effective in inhibiting the enzyme compared to the ethanolic extract. The extract from five chili peppers displayed xanthine oxidase inhibitory activity, with IC₅₀ values ranging from 5.36-34.86 and 28.76-87.63 µg/ml. when using acetonitrile and ethanol as the solvent, respectively. Additionally, the acetonitrile extract of Prik Khee Noo and Prik Khee Noo Suan did not significantly inhibit of xanthine oxidase activity compared to the standard capsaicin (4.02±0.14 µg/ml) and allopurinol (3.13±0.11 µg/ml). This study provides new insights into the potential use of chili pepper extracts, especially Prik Khee Noo and Prik Khee Noo Suan as a source of xanthine oxidase inhibitors.

*Corresponding author

E-mail address: suwatchai.mis@lru.ac.th (S. Misuna)

Online print: 19 October 2023 Copyright © 2023. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2023.23>