

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของยี่โถ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ณพัฐอร บัวฉวน^{1*}

Received : March 17, 2025

Revised : December 12, 2025

Accepted : December 18, 2025

บทคัดย่อ

ยี่โถ (*Nerium oleander* L.) เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae ที่ใช้ในตำราสมุนไพรพื้นบ้าน แต่การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในทุกส่วนของพืชยังมีจำกัด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่ง โดยทำการสกัดด้วยเอทานอล 95% ด้วยวิธีการหมัก ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบดอกยี่โถมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด และมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุดในทุกการทดสอบ โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Salmonella typhimurium* ได้ดีกว่าส่วนใบและกิ่ง โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากดอกยี่โถมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสำหรับผลิตภัณฑ์ปรับสภาพผิว สารยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสสำหรับการรักษาโรคเกาต์ และและสารต้านเชื้อจุลชีพ อย่างไรก็ตาม การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากยี่โถควรคำนึงถึงความปลอดภัยเนื่องจากพบสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ซึ่งมีความเป็นพิษสูง และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสกัดแยกและทดสอบความปลอดภัยของสารออกฤทธิ์ในระดับคลินิกต่อไป

คำสำคัญ: ยี่โถ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อีเมล: napattaom@vru.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: napattaom@vru.ac.th

QUANTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN CRUDE EXTRACTS FROM DIFFERENT PARTS OF *Nerium oleander* L., AND THEIR ANTIOXIDANT, TYROSINASE INHIBITORY, XANTHINE OXIDASE INHIBITORY, AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

Napattaorn Buachoon^{1*}

Abstract

Nerium oleander L. is a plant from the Apocynaceae family traditionally used in herbal medicine; however, comprehensive studies on the bioactivities of all plant parts remain limited. This study aimed to determine the total phenolic and flavonoid contents and to compare the bioactivities of crude extracts obtained from the leaves, flowers, and stems of *N. oleander*. Extraction was performed using 95% ethanol through maceration. The results revealed that the flower extract exhibited the highest levels of total phenolics and flavonoids, along with the strongest bioactivities across all assays. Specifically, the flower extract demonstrated potent antioxidant activity, tyrosinase inhibitory activity, xanthine oxidase inhibitory activity, and antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella typhimurium*, performing better than the leaf and stem extracts, with activities comparable to those of the standard references. These findings suggest that *N. oleander* flower extracts demonstrate high potential for development as natural antioxidants, tyrosinase inhibitors for skin-conditioning products, xanthine oxidase inhibitors for gout treatment, and antimicrobial agents. Nevertheless, product development from *N. oleander* must carefully address safety concerns, as the plant contains highly toxic cardiac glycosides. Further studies on compound isolation and clinical safety evaluations are warranted to support future applications.

Keywords: *Nerium oleander* L., Antibacterial activity, Antioxidant activity, Tyrosinase inhibitory activity, Xanthine oxidase inhibitory activity

¹ Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, e-mail: napattaorn@vru.ac.th

* Corresponding author, e-mail: napattaorn@vru.ac.th

บทนำ

อีโกล (Nerium oleander L.) เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae ที่มีการใช้ในแพทย์แผนโบราณมาเป็นเวลานาน โดยพบการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในภูมิภาคเมดิเตอร์เรเนียน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และในหลายพื้นที่ทั่วโลกที่มีภูมิอากาศกึ่งร้อน (Mohadjerani, 2012) อีโกลเป็นไม้พุ่มไม่ผลัดใบที่มีความสูงประมาณ 2-5 เมตร ลักษณะเด่นคือมีดอกสีชมพู แดง หรือขาว ซึ่งนิยมปลูกเป็นไม้ประดับเนื่องจากความสวยงาม อย่างไรก็ตาม อีโกลเป็นไม้ออกที่มีสรรพคุณทางยาหลายประการ เช่น ผล ขับปัสสาวะ ดอก แก้อักเสบ แก้ปวดศีรษะ ใบ ใช้เป็นยารักษาโรคหัวใจ นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาฆ่าแมลง และยาเบื่อหนูได้ จากการศึกษาข้อมูลทางพฤกษเคมีพบว่า อีโกลมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) แอลคาลอยด์ (alkaloids) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) และไกลโคไซด์ (glycosides) (Calderón-Montaño et al., 2013) และยังพบองค์ประกอบทางเคมีที่มีพิษคือ ไกลโคไซด์คาร์ดิแอก (cardiac glycosides) โอลีแอนดริน (oleandrin) และเนอริโอไซด์ (nerioside) องค์ประกอบทางพฤกษเคมีเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Mohadjerani, 2012; Mouhcine et al., 2019) ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์หลายชนิด รวมถึงเอนไซม์ ไทโรซิเนส (tyrosinase) และฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Mouhcine et al., 2019)

ภาวะเครียดออกซิเดทีฟ (oxidative stress) เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและระบบต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด (Liguori et al., 2018) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจในการพัฒนาเป็นยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) มีบทบาทสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของสีผิว สารยับยั้งเอนไซม์นี้จึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปรับสีผิว และดูแลปัญหาผิวพรรณ ขณะที่เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) มีบทบาทในการเปลี่ยนฮิปแซนทีนเป็นกรดยูริก พร้อมกับการสร้างอนุมูลอิสระชนิด Reactive Oxygen Species (ROS) เกี่ยวข้องกับภาวะกรดยูริกสูง (hyperuricemia) และโรคเก๊าท์ (gout) (Dalbeth et al., 2016) สารยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจึงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ

จากองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่หลากหลาย โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออกซิเดชัน เช่น ไทโรซิเนส จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารกลุ่มเดียวกันนี้จะมีผลในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสด้วย โดยกลไกสำคัญ ได้แก่ การจับกับตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ หรือการแย่งจับกับไอออนโลหะที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ (Cos et al., 2006; Umamaheswari et al., 2009) ถึงแม้จะมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอีโกลในหลายด้าน แต่งานวิจัยก่อนหน้าทำการศึกษาเพียงส่วเดียวใดส่วนหนึ่งของพืชชนิดนี้ และการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของอีโกล (ดอก ใบ และกิ่ง) ยังมีจำกัด โดยเฉพาะการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสซึ่งยังมีรายงานน้อยมากและที่สำคัญในบริบทของพืชที่เติบโตในประเทศไทย ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมเฉพาะที่อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช การศึกษาในบริบทเฉพาะของประเทศไทยจึงมีความสำคัญในการค้นหาศักยภาพที่แท้จริงของพืชท้องถิ่น

ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช กระบวนการเตรียมตัวอย่างและวิธีการสกัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากมีผลต่อปริมาณและชนิดของสารที่สกัดได้ วิธีการหมัก (maceration) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารจากพืชสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ใช้ความร้อนสูง และเหมาะกับการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ไวต่อความร้อน (Azwanida, 2015; Handa, 2008)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบ ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และต้านเชื้อแบคทีเรีย) ของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งของยี่โถ ผลการศึกษาจะช่วยเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรรักษาโรคที่อาจนำไปสู่การค้นพบสารออกฤทธิ์ใหม่ทางการแพทย์และเวชสำอาง และพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม ซึ่งสอดคล้องกับเป้าหมายการพัฒนาที่ยั่งยืนหลายประการ ได้แก่ SDG 3 ด้วยการสร้างสุขภาพและความเป็นอยู่ที่ดี SDG 12 ด้านการบริโภคและการผลิตที่ยั่งยืน และ SDG 15 ด้านการใช้ประโยชน์จากระบบนิเวศทางบก รวมถึง SDG 10 ด้านช่วยลดความเหลื่อมล้ำ ผ่านการใช้ทรัพยากรและภูมิปัญญาท้องถิ่นอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมและสกัดยี่โถ

ยี่โถที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ดอก ใบ และกิ่ง นำมาจากจังหวัดสระแก้ว เดือนเมษายน 2567 ทำการเก็บส่วนต่างๆ ดังนี้ ดอกเก็บเฉพาะดอกที่บ้านเต็มๆ และยังไม่ร่วงโรย เพื่อให้ได้สารสำคัญในช่วงที่มีความเข้มข้นสูง ใบ เก็บจากใบแก่สีเขียวเข้มซึ่งอยู่บริเวณกึ่งกลางถึงปลายซึ่งเป็นตำแหน่งที่ได้รับแสงแดดเพียงพอ และมีการสังเคราะห์สารสำคัญสูงโดยไม่ใช้ใบอ่อนหรือใบแก่จัดที่ใกล้หลุดร่วง และกิ่งใช้เฉพาะกิ่งขนาดเล็กถึงปานกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5–1.5 ซม.) ที่ยังไม่แข็งมาก โดยตัดจากบริเวณกึ่งด้านข้างของลำต้น ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตเชิงเคมีอย่างต่อเนื่อง และนำยี่โถส่วนต่าง ๆ มาแยกส่วน ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้งเป็นชิ้นเล็ก อบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง เมื่อน้ำหนักของแต่ละส่วนคงที่บดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก นำผงของส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ มาอย่างละ 500 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการหมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน กรองเก็บสารละลาย นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่งน้ำหนัก และคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบส่วนต่างๆของยี่โถ

การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ (%w/w) = (น้ำหนักสารสกัดหยาบ(กรัม) × 100) / น้ำหนักแห้ง(กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ชั่งสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ 10 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 99% ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดตัวอย่างส่วนต่างๆ ของยี่โถมา 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เติม Folin-ciocalteu reagent 0.2 มิลลิลิตร เติมหาละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% Na₂CO₃) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เติม Folin-ciocalteu reagent 0.2 มิลลิลิตร เติมหาละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% Na₂CO₃) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (VL, 1999)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ชั่งสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ 10 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 99% ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของยี่โถมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (10% $AlCl_3$) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลายอะซิติกแอซิก (10% CH_3COOH) 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินที่ความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปีเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (10% $AlCl_3$) มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลายอะซิติกแอซิก (10% CH_3COOH) 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น และทำการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Prommuak et al., 2008)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) และแอลฟา-โทโคฟีรอล (α -tocopherol) และสารสกัดหยาบตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 25, 50, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นปีเปตสารละลายมาตรฐานและสารสกัดแต่ละความเข้มข้นที่ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายแอ็บโซลูทเอทานอล (absolute ethanol) 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Prommuak et al., 2008) คำนวณหา % radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100$$

โดย A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า inhibitory concentration (IC_{50}) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % Radical scavenging

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

เตรียมสารละลาย ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ที่ความเข้มข้น 7.4 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ที่ความเข้มข้น 2.6 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลาย ABTS และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 12-16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS radical นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 99% ให้ได้ค่าการดูดกลืนคลีนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่นที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 25, 50, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่าง

แต่ละความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS radical 950 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 และทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT, BHA และ แอลฟา-โทโคฟีรอล เหมือนสารตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เปรียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ BHT, BHA และ แอลฟา-โทโคฟีรอล (Amao et al., 2001)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ Dopachrome method โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งเป็นสารควบคุมเชิงบวก เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่ความเข้มข้น 25, 50 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเอทานอล 99% นำสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมา 40 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 125 ยูนิต/มิลลิลิตร 40 ไมโครลิตร เติมสารละลายควบคุม (sodium phosphate buffer 50 มิลลิโมลาร์, pH 6.8) 80 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA (butylated hydroxyanisole) 40 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader รุ่น EnSpire 2300N สำหรับชุดควบคุมไม่เติมสารตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Zare et al., 2024; Derić et al., 2016; Napagoda et al., 2018) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% tyrosinase Inhibition) ดังสมการ

$$\% \text{ tyrosinase Inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดกับ % tyrosinase Inhibition เพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (IC₅₀)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดตัวอย่าง โดยผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.5) 130 ไมโครลิตร กับสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐานอัลโลพิวรีนอล (allopurinol) (ความเข้มข้น 0.1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร และเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) (0.1 ยูนิต/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายแซนทีน (0.15 มิลลิโมลาร์) 100 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1 โมลาร์ 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งแสดงถึงปริมาณของกรดยูริกที่สร้างขึ้นที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader รุ่น EnSpire 2300N ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Nguyen et al., 2004) ตัวควบคุมเชิงบวกคือ สารมาตรฐานอัลโลพิวรีนอล คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (% xanthine oxidase Inhibition)

$$\% \text{ xanthine oxidase Inhibition} = (\Delta A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / \Delta A_{\text{control}} \times 100$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดกับ % Xanthine oxidase Inhibition เพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ 50% (IC₅₀)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบโดยวิธี agar well diffusion method

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR746, *Bacillus cereus* TISTR 1449 และแกรมลบคือ *Salmonella typhimurium* TISTR1472 โดยวิธี agar well diffusion method เตรียมเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 10^8 CFU /มิลลิลิตร โดยทำการเทียบ กับ McFarland standard #0.5 ด้วยอาหารเหลว NB หลังจากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth(MHA) ในจานเพาะเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งตัว ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบที่ปรับความเข้มข้นแล้ว นำมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้ทั่วทั้งจาน โดยป้ายแบบ 3 ระบาย หมุนจานเพาะเชื้อ 60 องศา ในแต่ละระบาย เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วทั้งจาน ทำการเจาะหลุมโดยใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจาน นำสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยการเจือจางสารสกัดหยาบเข้มข้น (500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งได้จากการสกัดยีส 500 กรัมในเอทานอล 95% ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร) ด้วย 1% DMSO (dimethyl sulfoxide) ในอัตราส่วน 1:10 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ใส่ในจานอาหารปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำจานเพาะเชื้อไปวางที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารทดสอบแพร่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำจานเพาะเชื้อมาตรวจผลโดยทำวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ หน่วย มิลลิเมตร โดยใช้ 1% DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ และใช้สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และเตตระไซคลิน (tetracycline) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ทำการประเมินผลการยับยั้งของสารสกัด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Balouiri et al., 2016; Clinical & Laboratory Standards Institute, 2021)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibition concentration; MIC) โดยวิธี tube dilution method

ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 10^8 CFU/มิลลิลิตร โดยเทียบกับ McFarland standard #0.5 แล้วทำการเจือจางเชื้อลง 100 เท่า ด้วยอาหารเหลว MHB เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1.5×10^6 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่าง ได้แก่ สารสกัดจากใบ ดอก และกิ่งของ ยี่โถ ในช่วงความเข้มข้น 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียม 96-well microtiter plate โดยเติมอาหารเหลว MHB ลงในแต่ละหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงไปในแต่ละหลุมที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดในปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ตัวควบคุมเชิงลบ คือ 1% DMSO ตัวควบคุมเชิงบวก คือ ไซยาไนด์ชีวเนมาตรฐาน เช่น เตตระไซคลิน และสเตรปโตมัยซิน และตัวควบคุม คือ ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย หลังการบ่ม นำผลจาก microtiter plate ที่ผ่านการบ่มเชื้อมาใช้ เข้มเขี่ยเชื้อขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง (MHA) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยพิจารณา ค่า MIC จากความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร ทั้งนี้ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ (Balouiri et al., 2016)

การศึกษาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (minimal bactericidal concentration: MBC) ด้วยวิธี plate dilution

นำสารสกัดตัวอย่างมาทำการเจือจางลงในอาหาร MHB (mueller hinton broth) เพาะเชื้อแบคทีเรีย โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจการทำลายเชื้อทดสอบดูการกระจายเชื้อบนผิวอาหาร MHB ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย อ่านค่า MBC โดยค่า MBC ที่อ่านได้คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ทำให้ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อในจานอาหารที่ทดสอบ ทั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Balouiri et al., 2016)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple-range tests ที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของยี่โถ

เมื่อนำส่วนต่างๆ ของยี่โถ ได้แก่ ใบ ดอก และกิ่ง มาอบแห้ง ทำการบดให้ละเอียด สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองและระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของเหลวข้นเหนียวสีน้ำตาล น้ำหนักและร้อยละของสารสกัดหยาบ ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักและร้อยละของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งของยี่โถ

ชนิดของสารสกัดเอทานอล	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	ร้อยละสารสกัดหยาบ
ใบ	39.23	7.84
ดอก	42.59	8.51
กิ่ง	30.45	6.09

จากตารางที่ 1 เมื่อนำส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ ได้แก่ ใบ ดอก และกิ่ง ไปทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบจากดอกยี่โถ มีน้ำหนักสารสกัดหยาบสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบเท่ากับ 8.51 รองลงมาคือ สกัดหยาบจากใบยี่โถ คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบ เท่ากับ 7.84 ผลการศึกษานี้พบว่า ร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Nithya et al., (2016) ซึ่งรายงานว่าร้อยละของสารสกัดเอทานอลจากพืชในวงศ์เดียวกันอยู่ในช่วง 5-10% ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ส่วนที่ใช้ และฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง ความแตกต่างของปริมาณสารสกัดในแต่ละส่วนของพืชอาจเนื่องมาจากหน้าที่ทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ ได้แก่ ใบ ดอก และกิ่ง พบว่า สารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ระหว่าง 31.66 ± 2.27 ถึง 60.33 ± 1.00 mg GAE/g extract โดยสารสกัดหยาบดอกยี่โถมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 60.33 ± 1.00 mg GAE/g extract การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 25.65 ± 3.31 ถึง 36.70 ± 0.89 mg QE/g extract โดยพบว่าสารสกัดหยาบดอกยี่โถมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด 36.70 ± 0.89 mg QE/g extract ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ

สารสกัดหยาบ	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)
ใบยี่โถ	49.42 ± 0.75 ^B	30.34 ± 0.95 ^B
ดอกยี่โถ	60.33 ± 1.00 ^A	36.70 ± 0.89 ^A
กิ่งยี่โถ	31.66 ± 2.27 ^C	25.65 ± 3.31 ^C

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

การที่ดอกยี่โถมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุดอาจสัมพันธ์กับศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย Teugwa et al., (2013) รายงานว่า ปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่สูงในพืชวงศ์ Apocynaceae มีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านเบาหวาน ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wen et al., (2017) ที่พบว่า พืชวงศ์ Apocynaceae ส่วนดอกจะมีการสะสมสารทุติยภูมิในปริมาณสูงกว่าส่วนอื่น ๆ เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เนื่องจากส่วนดอกมีบทบาทสำคัญในการให้สี กลิ่น และป้องกันดอกจากการทำลายของรังสี UV และแมลงศัตรูพืช

การที่ส่วนดอกมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าส่วนอื่นๆ อาจเกี่ยวข้องกับกลไกทางสรีรวิทยาของพืช โดย Zhang et al., (2007) ได้อธิบายว่า พืชจะมีการสะสมสารทุติยภูมิในปริมาณสูงในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่น ดอก เพื่อป้องกันอวัยวะสืบพันธุ์และดึงดูดแมลงผสมเกสร ขณะที่ส่วนกิ่งซึ่งมีหน้าที่หลักในการลำเลียงน้ำและอาหาร อาจมีความจำเป็นในการสะสมสารเหล่านี้น้อยกว่า นอกจากนี้การที่ส่วนต่างๆ ของยี่โถมีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันอาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางพฤกษศาสตร์ระดับเซลล์ Gama et al. (2017) พบว่า ในพืชวงศ์ Apocynaceae มีโครงสร้างเฉพาะที่เรียกว่า laticifers ซึ่งเป็นท่อน้ำยางที่มีการสะสมสารทุติยภูมิในปริมาณสูง โดยส่วนดอกจะมีความหนาแน่นของโครงสร้างนี้มากกว่าส่วนอื่น ๆ ซึ่งอาจอธิบายการสะสมสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่สูงกว่าในส่วนดอก

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical ของสารสกัดหยาบส่วนต่างๆ ของยี่โถ ได้แก่ ใบ ดอก และกิ่ง พบว่า สารสกัดหยาบดอกยี่โถมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.45 ± 0.34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยาบใบยี่โถ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.71 ± 0.45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHA, BHT และ แอลฟา-โทโคฟีรอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.25 ± 0.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 14.25 ± 0.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 17.56 ± 0.41 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลดังตารางที่ 3

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ของสารสกัดหยาบส่วนต่างๆ ของยี่โถ ได้แก่ ใบ ดอก และกิ่ง พบว่า สารสกัดหยาบดอกยี่โถมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.94 ± 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยาบใบยี่โถ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.80 ± 0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHA, BHT และ แอลฟา-โทโคฟีรอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.76 ± 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 13.86 ± 0.18 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 15.52 ± 0.45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลดังตารางที่ 3

ในการศึกษานี้ได้ใช้วิธี DPPH assay และ ABTS assay เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ ได้แก่ ใบ ดอก และกิ่ง เนื่องจากทั้งสองวิธีมีหลักการตรวจวัดที่แตกต่างกัน จึงให้ภาพรวมที่ครอบคลุมเกี่ยวกับศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้ดียิ่งขึ้น โดยที่ DPPH assay เป็นวิธีที่อาศัยการถ่ายโอนโปรตอนหรือไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระไปยังอนุมูลอิสระ DPPH• ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีความเสถียรในตัวเอง และแสดงสีม่วงเข้ม การที่สารต้านอนุมูลอิสระสามารถเปลี่ยน DPPH• ให้กลายเป็นสารที่ไม่เป็นอนุมูลได้จะทำให้สีของสารละลายจางลง ซึ่งสามารถวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของความเข้มแสงได้ โดยวิธีนี้เหมาะสำหรับประเมินสารที่มีคุณสมบัติ hydrogen-donating ability และวิธี ABTS assay อาศัยหลักการถ่ายโอนอิเล็กตรอน และโปรตอนไปยังอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งสามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำ และสารอินทรีย์ จึงเหมาะสำหรับการตรวจวัดสารออกฤทธิ์ทั้งที่มีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non-polar) อีกทั้งยังไวต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายในน้ำ เช่น ฟีนอลิก และกลุ่มที่ละลายในไขมัน เช่น วิตามินอี ผลการทดลองทั้งสองวิธีสอดคล้องกันคือ สารสกัดหยาบจากดอกยี่โถมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือใบ และต่ำสุดคือกิ่ง สะท้อนถึงความสามารถในการบริจาคโปรตอนหรืออิเล็กตรอนเพื่อยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีของสารสกัดจากดอกยี่โถ ซึ่งมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดในทั้งสองวิธี โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เช่น BHA, BHT และแอลฟา-โทโคฟีรอล พบว่า สารสกัดจากดอกยี่โถมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ BHT และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าใบ และกิ่งอย่างมีนัยสำคัญ สาเหตุที่สารสกัดจากดอกยี่โถมีฤทธิ์สูงสุด สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ซึ่งพบว่า จะมีปริมาณสูงที่สุดในส่วนของดอก ทั้งนี้เนื่องจากดอกไม้เป็นอวัยวะที่สัมผัสกับรังสี UV โดยตรง และต้องการกลไกป้องกันตนเอง จึงมีการสะสมสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เช่น เควอซิทิน รูทีน และฟลาโวนอยด์ ชนิดอื่น ๆ มากกว่าส่วนอื่นของพืช (Lu et al., 2014) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saeed et al. (2012) ที่อธิบายว่าสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการให้อะตอมไฮโดรเจนให้กับอนุมูลอิสระ และยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดออกซิเดชัน แม้ว่าทั้ง DPPH และ ABTS จะใช้หลักการประเมินที่คล้ายคลึงกัน แต่ความแตกต่างทางเคมีของอนุมูลที่ใช้ในแต่ละวิธี ทำให้สามารถแยกแยะความสามารถของสารออกฤทธิ์แต่ละกลุ่มได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น การใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชอย่างครอบคลุม

ตารางที่ 3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ

สาร	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
	DPPH assay IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ABTS assay IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัดหยาบจากใบยี่โถ	18.71 ± 0.45^D	16.80 ± 0.36^D
สารสกัดหยาบจากดอกยี่โถ	15.45 ± 0.34^B	13.94 ± 0.10^A
สารสกัดหยาบจากกิ่งยี่โถ	21.19 ± 0.39^E	18.83 ± 0.24^E
สารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอล	17.56 ± 0.41^C	15.52 ± 0.45^C
สารมาตรฐาน BHT	14.25 ± 0.35^A	13.86 ± 0.18^A
สารมาตรฐาน BHA	15.94 ± 0.51^B	14.76 ± 0.14^B

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ พบว่า สารสกัดหยาบดอกยี่โถมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} 15.56 ± 0.51 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยาบใบยี่โถ โดยมีค่า IC_{50} 17.15 ± 0.23 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.72 ± 0.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ

สารสกัดหยาบ	Tyrosinase Inhibitory activity IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ใบยี่โถ	17.15 ± 0.23^B
ดอกยี่โถ	15.56 ± 0.51^A
กิ่งยี่โถ	18.51 ± 0.37^C
สารมาตรฐานกรดโคจิก	15.72 ± 0.31^A

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

สารสกัดหยาบจากดอกยี่โถมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าส่วนอื่น ๆ สอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบสูงในดอก Zengin et al., (2014) รายงานว่า สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยสาร เช่น เควอซีทิน และแคมเฟอรอล สามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกยี่โถที่ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก และสอดคล้องกับการศึกษาของ Muddathir et al., (2017) ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในพืชวงศ์ Apocynaceae ส่วนสารสกัดกิ่งมีฤทธิ์น้อยที่สุดสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่ต่ำ สารเหล่านี้ยับยั้งเอนไซม์โดยจับกับไอออนทองแดงในบริเวณเร่ง ผลการศึกษานี้แสดงถึงศักยภาพของสารสกัดดอกยี่โถในการพัฒนาเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากธรรมชาติสำหรับผลิตภัณฑ์ปรับสภาพผิวหรือด้านการเกิดรอยดำจากแสงแดด

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ พบว่า สารสกัดหยาบดอกยี่โถมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} 15.49 ± 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยาบใบยี่โถ โดยมีค่า IC_{50} 17.60 ± 0.54 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานอัลโลพูรินอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.23 ± 0.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งของยี่โถ

สารสกัดหยาบ	xanthine oxidase inhibitory activity IC ₅₀ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ใบยี่โถ	17.60 ± 0.54 ^B
ดอกยี่โถ	15.49 ± 0.40 ^A
กิ่งยี่โถ	19.46 ± 0.43 ^C
สารมาตรฐานอัลโลพูรีนอล	16.23 ± 0.00 ^{AB}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

สารสกัดหยาบจากดอกยี่โถมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สูงกว่าส่วนอื่น ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์กับค่า IC₅₀ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Havlik et al., (2010) ที่พบว่าพืชวงศ์ Apocynaceae มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอล และแทนนินที่ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส โดยส่วนดอกมักมีฤทธิ์สูงกว่าเนื่องจากการสะสมสารทุติยภูมิมากกว่า Cos et al., (1998) รายงานว่า ฟลาโวนอยด์ เช่น เควอซิทิน แคมเฟอร์อล และลูทีโอลิน มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดยูริก Nguyen et al., (2020) พบว่า กลไกการยับยั้งขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ โดยโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่ง C-5 และ C-7 และพันธะคู่ระหว่าง C-2 และ C-3 มีฤทธิ์สูง นอกจากนี้ Li et al., (2024) รายงานว่า quercetin และอนุพันธ์มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอัลโลพูรีนอล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในที่พบว่า สารสกัดดอกยี่โถมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอัลโลพูรีนอลแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากธรรมชาติสำหรับรักษาโรคเก๊าท์

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. aureus* TISTR746 *S. typhimurium* TISTR1472 และ *B. cereus* TISTR1449 ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคเกี่ยวกับอาหารเป็นพิษและโรคท้องร่วง โดยสารสกัดหยาบดอกยี่โถสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR746 ได้ดี โดยมีค่า Inhibition zone มากที่สุด เท่ากับ 7.45 ± 0.16 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *B. cereus* TISTR1449 และ *S. typhimurium* TISTR1472 โดยมีค่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 6.84 ± 0.04 มิลลิเมตร และ 6.12 ± 0.09 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ยังไม่สามารถยับยั้งได้ดี เมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะมาตรฐานสเตรปโตมัยซิน และเตตระไซคลิน และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบซึ่งใช้สารละลาย 1% DMSO ไม่พบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ

สาร	ผลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด (Inhibition zone, mm.± SD)		
	<i>S. aureus</i> TISTR746	<i>S. typhimurium</i> TISTR1472	<i>B. cereus</i> TISTR1449
สารสกัดหยาบจากใบยี่โถ	5.36 ± 0.05 ^D	4.09 ± 0.07 ^D	5.11 ± 0.09 ^D
สารสกัดหยาบจากดอกยี่โถ	7.45 ± 0.16 ^C	6.12 ± 0.09 ^C	6.84 ± 0.04 ^C
สารสกัดหยาบจากกิ่งยี่โถ	3.42 ± 0.22 ^E	2.81 ± 0.12 ^E	3.02 ± 0.02 ^E
1% DMSO	-	-	-
สเตอโรโตมัยซิน	12.47 ± 0.19 ^A	10.39 ± 0.22 ^B	12.26 ± 0.10 ^A
เตตระไซคลิน	12.04 ± 0.06 ^B	10.42 ± 0.12 ^A	11.84 ± 0.11 ^B

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

- ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดหยาบดอกยี่โถมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนอื่น ๆ ของยี่โถ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jahan et al. (2011) ที่พบว่า พืชวงศ์ Apocynaceae ส่วนดอกมีการสะสมสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพสูง Rahman et al. (2014) รายงานว่า สารสกัดจากพืชในวงศ์นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* เนื่องจากมีสารที่ออกฤทธิ์เฉพาะต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก Cushnie & Lamb (2005) พบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์กับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียผ่านกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ Simoes et al. (2009) อธิบายว่า สารสกัดจากพืชออกฤทธิ์ผ่านกลไกที่หลากหลายทำให้แบคทีเรียพัฒนาการดื้อยาได้ยากกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐาน Kozłowska et al. (2022) พบว่า สารสกัดพืชสามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะ และ Hussein et al. (2013) อธิบายว่า การที่กิ่งยี่โถมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำ เนื่องจากส่วนกิ่งมีลิกนิน และเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก แต่มีสารทุติยภูมิน้อยกว่าส่วนดอก และใบซึ่งมีเมแทบอลิซึมสูง และมักสะสมสารต้านจุลชีพในปริมาณมากกว่า และผลจากการทดสอบกับตัวควบคุมเชิงลบซึ่งใช้สารละลาย 1% DMSO ไม่พบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียใด ๆ ผลที่ได้ยืนยันว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ตรวจพบ เป็นผลจากสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในสารสกัดยี่โถโดยตรง ไม่ใช่ผลข้างเคียงหรืออิทธิพลจากตัวทำละลายเอทานอลที่ใช้ในกระบวนการสกัด

ตารางที่ 7 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดหยาบจากใบ ดอก และกิ่งยี่โถ

สารสกัดหยาบจาก ส่วนต่างๆ ของยี่โถ	<i>S. aureus</i> TISTR746		<i>S. typhimurium</i> TISTR1472		<i>B. cereus</i> TISTR1449	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)
ใบยี่โถ	12.5	50	12.5	50	12.5	50
ดอกยี่โถ	12.5	50	12.5	50	12.5	50
กิ่งยี่โถ	25	50	25	50	25	50

จากตารางที่ 7 พบว่า สารสกัดหยาบใบและดอกยี่โถมีค่า MIC เท่ากันที่ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* TISTR746 *S. typhimurium* TISTR1472 และ *B. cereus* TISTR1449 ในขณะที่สารสกัดจากกิ่งยี่โถมีค่า MIC ที่ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากทุกส่วนของยี่โถมีค่า MBC เท่ากันที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากใบ และดอกยี่โถมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากกิ่งยี่โถ แต่อย่างไรก็ตามทุกส่วนของยี่โถมีความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ค่า MBC ที่สูงกว่า MIC 2-4 เท่า สอดคล้องกับงานของ Abdallah (2020) ที่พบว่า สารสกัดพืชต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่าในการฆ่าเชื้อเมื่อเทียบกับการยับยั้ง เนื่องจากสารทุติยภูมิในพืชจะยับยั้งเมแทบอลิซึมมากกว่าทำลายโครงสร้างเซลล์โดยตรง ขณะที่ค่า MIC ที่เท่ากัน (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดหยาบใบ และดอกต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด และสอดคล้องกับ Naz et al. (2021) ที่พบว่า พืชวงศ์ Apocynaceae มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแบบกว้าง มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันทั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ โดยสารสกัดกิ่งมีค่า MIC สูงกว่า (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แต่มีค่า MBC เท่ากับส่วนอื่น (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) อธิบายได้จาก Jaberian et al. (2013) ที่พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันในส่วนต่าง ๆ ของพืชส่งผลต่อกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน ส่วนอัตราส่วน MBC:MIC ของสารสกัดใบ และดอก และกิ่ง แสดงถึงฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (Bactericidal)

สรุป

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบยี่โถจากส่วนต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการสกัดส่วนต่าง ๆ ของยี่โถ ได้แก่ ใบ ดอก และกิ่งด้วยเอทานอล พบว่า ดอกให้ร้อยละสารสกัดสูงสุด และสารสกัดหยาบดอกยี่โถมีปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบจากใบ และกิ่งยี่โถ เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส สารสกัดหยาบดอกยี่โถมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบจากใบ และกิ่งยี่โถ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดหยาบจากดอก และใบดีกว่าสารสกัดจากกิ่ง ในขณะที่ฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ทั้งสามส่วนไม่แตกต่างกัน

ข้อค้นพบที่สำคัญของงานวิจัยนี้คือ การแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากดอกยี่โถมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ แชนทีนออกซิเดสโดยมีค่าใกล้เคียงกับ allopurinol ที่เป็นยามาตรฐานในการรักษาโรคเก๊าท์ ซึ่งสารสกัดหยาบ ดอกยี่โถมีศักยภาพในการที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ และความงาม โดยเฉพาะในด้านการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการยับยั้งเอนไซม์แชนทีนออกซิเดส อย่างไรก็ตาม การตรวจพบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในทุกส่วนของยี่โถเป็นประเด็นที่ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ โดยอาจต้องมีการสกัดแยก บริสุทธิ์ หรือควบคุมปริมาณของสารกลุ่มนี้เพื่อลดความเสี่ยงจากความเป็นพิษ

ทั้งนี้ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาขั้นต้น (preliminary study) ที่ดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับคลินิก เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยในมนุษย์ก่อนนำไปใช้จริงในผลิตภัณฑ์ทางสุขภาพหรือเครื่องสำอาง

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์จากดอกยี่โถ กลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล การศึกษาด้านพิษวิทยา เพื่อความปลอดภัยในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ต่อไป และนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อสุขภาพ และความงาม และเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรไทยอย่างยั่งยืน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่สำหรับการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Abdallah, E. M. (2020). Plants: An alternative source for antimicrobials. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 1(6), 16-20.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, 73(2), 239-244.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Med aromat plants**, 4(196), 2167-0412.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6(2), 71-79.
- Calderón-Montaño, J. M., Burgos-Morón, E., Orta, M. L., Mateos, S., & López-Lázaro, M. (2013). A hydroalcoholic extract from the leaves of *Nerium oleander* inhibits glycolysis and induces selective killing of lung cancer cells. **Planta Medica**, 79(12), 1017-1023.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2021). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing** (31st ed.). CLSI supplement M100.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Vanden Berghe, D., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, 106(3), 290-302.

- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., & Vanden Berghe, D. (1998). Structure–Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. **Journal of Natural Products**, 61(1), 71–76.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26(5), 343–356.
- Dalbeth, N., Merriman, T. R., & Stamp, L. K. (2016). Gout. **The Lancet**, 388(10055), 2039-2052.
- Deriňá, B., Sasinková, V., & Kováčová, E. (2016). The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. **Scientific Reports**, 6(1), 34993.
- Gama, T. D. S. S., Rubiano, V. S., & Demarco, D. (2017). Laticifer development and its growth mode in *Allamanda blanchetii* A. DC.(Apocynaceae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, 144(3), 303-312.
- Handa, S. S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**, 1(1), 21-40.
- Havlik, J., de la Huebra, R. G., Hejtmankova, K., Fernandez, J., Simonova, J., Melich, M., & Rada, V. (2010). Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, 132(2), 461-465.
- Hussain, M., Bakhsh, H., Aziz, A., Majeed, A., Khan, I. A., Mujeeb, A., & Farooq, U. (2013). Comparative In vitro study of antimicrobial activities of flower and whole plant of *Jasminum officinale* against some human pathogenic microbes. **Journal of Pharmacy and Alternative Medicine**, 2(4), 33-43.
- Jahan, S., Gosh, T., Begum, M., & Saha, B. K. (2011). Nutritional profile of some tropical fruits in Bangladesh: specially anti-oxidant vitamins and minerals. **Bangladesh Journal of Medical Science**, 10(2), 95-103.
- Kozłowska, M., Ścibisz, I., Przybył, J. L., Laudy, A. E., Majewska, E., Tarnowska, K., Małajowicz, J., & Ziarno, M. (2022). Antioxidant and antibacterial activity of extracts from selected plant material. **Applied Sciences**, 12(19), 9871.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, 13, 757-772.
- Li, J., Ni, Y., Li, J., & Fan, L. (2024). Xanthine oxidase inhibitory activity of quercetin and its derivatives: Interaction mechanism and evaluation methods. **Food Bioscience**, 59, 103982.
- Lu, Y., Knoo, T. J., & Wiert, C. (2014). Phytochemical analysis and antioxidant activity determination on crude extracts of *Melodinus eugeniifolus* barks and leaves from Malaysia. **Pharmacology & Pharmacy**, 5(8), 773–780.

- Mohadjerani, M. (2012). Antioxidant activity and total phenolic content of *Nerium oleander* L. grown in North of Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 11(4), 1121-1126.
- Mouhcine, M., Amin, L., Saaïd, A., Khalil, H., Laila, B., & Mohammed, E. M. (2019). Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of *Nerium oleander* collected in Morocco. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 12(1), 32-37.
- Muddathir, A. M., Yamauchi, K., Mitsunaga, T., & Batubara, I. (2017). Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants. **South African Journal of Botany**, 109, 9-15.
- Naz, R., Ayub, H., Nawaz, S., Islam, Z. U., Yasmin, T., Bano, A., Wakeel, A., Zia, S., & Roberts, T. H. (2021). Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 17(1), 302.
- Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q. L., Watanabe, H., & Kadota, S. (2004). Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 27(9), 1414-1421.
- Nithya, P. Y., Kala, S. J., & Mohan, V. R. (2016). Evaluation of total phenolics, flavonoid contents and in-vitro antioxidant properties of *Catharanthus pusillus* (Apocynaceae). **IJPSR**, 7, 3021-3027.
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A. T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T. K. (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. **Journal of ethnopharmacology**, 124(3), 646-648.
- Prommuak, C., D-Eknamkul, W. & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from thai silk waste and antioxidant activity of extract. **Separation and Purification Technology**, 62(2), 444-448.
- Rahman, M. M., Ahmad, S. H., Mohamed, M. T. M., & Ab Rahman, M. Z. (2014). Antimicrobial compounds from leaf extracts of *Jatropha curcas*, *Psidium guajava*, and *Andrographis paniculata*. **The Scientific World Journal**, 2014(1), 635240.
- Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. **BMC complementary and alternative medicine**, 12(1), 221.
- Zare, F., Sadeghian, S., Khoshneviszadeh, M., Pasbani, M., Sabet, R., & Sadeghpour, H. (2024). Assessment of Anti-tyrosinase and Antioxidant Activities along with Molecular Docking Studies, and in silico ADME of Some 3-Hydroxypyridin-4-one Derivatives. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, 10(3). 251.
- Simoes, M., Bennett, R. N., & Rosa, E. A. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural product reports**, 26(6), 746-757.

- VL, S. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152-178.
- Teugwa, C. M., Mejiato, P. C., Zofou, D., Tchinda, B. T., & Boyom, F. F. (2013). Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants: *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). **BMC complementary and alternative medicine**, 13(1), 175.
- Jaberian, H., Piri, K., & Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food chemistry**, 136(1), 237-244.
- Wen, L., Zhao, Y., Jiang, Y., Yu, L., Zeng, X., Yang, J., Tian, M., Liu, H., & Yang, B. (2017). Identification of a flavonoid C-glycoside as potent antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, 110, 92-101.
- Napagoda, M. T., Kumari, M., Qader, M. M., De Soyza, S. G., & Jayasinghe, L. (2018). Evaluation of tyrosinase inhibitory potential in flowers of *Cassia auriculata* L. for the development of natural skin whitening formulation. **European Journal of Integrative Medicine**, 21, 39-42.
- Zengin, G., Uysal, A., Güneş, E., & Aktümsek, A. (2014). Survey of phytochemical composition and biological effects of three extracts from a wild plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): A potential source for functional food ingredients and drug formulations. **PLOS ONE**, 9(11), e113527.
- Zhang, J., Subramanian, S., Zhang, Y., & Yu, O. (2007). Flavone synthases from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and are important for nodulation. **Plant Physiology**, 144(2), 741-751.