องค์ประกอบทางเคมี ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ การทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile)

Chemical constituents, cytotoxicity, inhibitory effect on nitric oxide production, α-glucosidase activity, and antioxidant activity of ethanol leaf extract from Gymnanthemum extensum (*Vernonia amygdalina* Delile)

วรินทร อินทน้ำเงิน[1], นพรัตน์ พุทธกาล[2*]
Varintorn Intanamgern[1], Nopparat Buddhakala[2*]

Received: 29 September 2021 ; **Revised:** 26 November 2021 ; **Accepted:** 30 December 2021

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริคออกไซด์และการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย พบว่า การวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS) พบสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด 10 ชนิด ได้แก่ Benzoic acid, Neophytadiene, Xylocaine, Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ether, Phytol, (z,z) -9,12-Octadecadienoic acid, (z,z,z) -9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (z,z,z) -9,12,15-Octadecatrienoic acid ethyl ester และ Octadecanoic acid ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัด และพบว่า สารสกัดเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์เม็ดเลือดขาว (RAW 264.7 macrophages) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 110.02 ± 0.86 มคก/มล สารสกัดสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ และยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้างไนตริก-ออกไซด์ ฤทธิ์ต้านเบาหวานออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีสารสำคัญในสารสกัดส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องในการออกฤทธิ์เหล่านี้ ผลการวิจัยยังสนับสนุนการใช้หนานเฉาเหว่ยรักษาโรคเบาหวานแบบพื้นบ้าน แต่ควรพิจารณาเมื่อพืชนี้ในปริมาณมาก

คำสำคัญ: สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย เอนไซม์แอลฟากูลโคซิเดส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Abstract

Investigation on the chemical constituents, cytotoxicity, inhibitory effect on nitric oxide (NO) production and α-glucosidase activity, and anti-oxidant activity of the ethanol leaf extract from *Vernonia amygdalina* Del. (LEVA) revealed that using Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS), ten chemical compounds, benzoic acid, neophytadiene, xylocaine, hexadecanoic acid, hexadecanoic acid ethyl ether, phytol, (z,z) -9,12-octadecadienoic acid, (z,z,z) -9,12,15-octadecatrien-1-ol, (z,z,z) -9,12,15-octadecatrienoic acid ethyl ester, and octadecanoic acid were present in LEVA. Some chemicals found in LEVA are being active compounds responded to the activities of LEVA. In addition, LEVA was cytotoxic to LPS-stimulated RAW 246.7 macrophages with IC_{50} value of 110.02±0.86 µg/ml. Moreover, LEVA exhibited inhibition of nitric oxide (NO) production and α-glucosidase activity, and possessed DPPH scavenging property. LEVA exerted

[1] นักศึกษาปริญญาโท, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
[1] Master of Science Student, Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand
[2] Assist. Prof. Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand
* Corresponding author; e-mail: nopparat_b@rmutt.ac.th

anti-inflammatory activity *via* an inhibition on NO production, an antidiabetic effect *via* an inhibition on α-glucosidase activity, and antioxidant activity *via* DPPH scavenging. It is likely that the bioactive compounds present in LEVA are responses to these activities. In additions the present study supported the traditional use of *V. amygdalina* for the diabetic treatment. However, application of high amount of this plant should be considered.

Keywords: *Vernonia amygdalina*, α-glucosidase, anti-oxidant activity, anti-inflammatory activity

บทนำ

การใช้ยาแผนปัจจุบัน มักเกิดปัญหาจากผลข้างเคียงในการใช้รักษาโรค และมีค่าใช้จ่ายสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่ต้องใช้ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานาน เช่น ยารักษาโรคเบาหวาน การรักษาโรคโดยปราศจากผลข้างเคียง หรือมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด เป็นความต้องการ และความท้าทายทางการแพทย์ การนำพืชสมุนไพรที่สามารถใช้ทดแทน หรือใช้ควบคู่กับยาแผนปัจจุบัน และให้ผลการรักษาได้ดี จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค

หนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile) เป็นพืชที่นิยมปลูกทั่วไปในเขตร้อนทั่วโลก ใบมีรสขม ใช้บริโภคเป็นผัก ประกอบในการปรุงอาหาร เช่น ซุป (Hutchioson *et al*., 1963) สรรพคุณทางทางภูมิปัญญาพื้นบ้าน มีการแปรรูปเป็นชาชงดื่ม เพื่อใช้คุมกำเนิด ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Yeap *et al*., 2010) ชาวบ้าน และหมอยาพื้นบ้านเชื่อว่า หนานเฉาเหว่ยลดน้ำตาลในเลือดได้ (Zakaria *et al*., 2018) จึงใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน (Okoduwa *et al*., 2017 ; Atangwho *et al*., 2012) ใช้บรรเทาอาการไข้ รักษาโรคตับอักเสบ มาลาเรีย คลื่นไส้ รักษาอาการผิดปกติของกระเพาะอาหาร แผลตามผิวหนัง ท้องเสีย ต่อมทอลซิลอักเสบ (Abebe, 1984) ท้องผูก ต้านพยาธิ (Igile *et al.,* 1994) ป้องกัน และรักษาโรคความดันโลหิตสูง (Saliu *et al*., 2012) ทุเลาปัญหาการขาดสารอาหาร (Tonukari *et al*., 2015) และรักษาโรคตับจากการดื่มแอลกอฮอล์ (Kaur *et al*., 2019) นอกจากนี้ มีการนำสารสกัดหนานเฉาเหว่ย มาใช้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาพยาธิ และการติดเชื้อจากโปรโตซัวและแบคทีเรีย (Kaur *et al.,* 2019) สำหรับสรรพคุณทางวิทยาศาสตร์นั้น มีรายงานว่า หนานเฉาเหว่ย มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ต้านมาลาเรีย ต้านการอักเสบ ปกป้องตับ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านพยาธิ ลดไข้ ลดไขมันในเลือด (Kaur *et al*., 2019) ต้านจุล-ชีพ (Ijeh and Ejike, 2011 ; Owolabi *et al*., 2008) และปกป้องไต (Hamman *et al*., 2016) เป็นต้น

ใบหนานเฉาเหว่ย อุดมไปด้วยสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (Tona *et al*., 2004 ; Igile *et al*., 1994 ; Udensi *et al*., 2002) สารสกัดจากใบ มีสารสำคัญ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) อัล-คาลอยด์ (Alkaloids) สเตียรอยด์ (Steroids) เทอร์-ปีนอยด์ (Terpenoids) ไกลโคไซด์ (Glycosides) แทนนิน (Tannins) ฟีนอล (Phenols) ซาโปนิน (Saponins) และโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) (Dégbé *et al.,* 2018 ; Alara *et al*., 2019)

มีรายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสกัดหนานเฉาเหว่ยว่า สารสกัดน้ำ ขนาด 500-2,000 มล/กก ที่ให้แก่หนูถีบจักร ทางหน้าท้องทุกวัน ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 14 วัน แม้ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ แต่ลดจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู (Njan *et al*., 2008) สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากใบ มีพิษเฉียบพลันน้อยมาก แต่สารสกัด ขนาด 600 มก/กก ที่ให้ต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน ทำให้เอนไซม์ Alanine transaminase (ALT), Aspartate transaminase (AST) และ Alkaline phosphatase (ALP) และคอเลสเตอรอล (Cholesterol) เพิ่มขึ้น (Nabukenya *et al*., 2014) สารสกัดจากใบเป็นพิษในระดับต่ำต่อหนูถีบจักร โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 2,000 มก/กก (Ibrahim *et al*., 2011) ก่อให้เกิดการแตกของโครโมโซม (Okwuzu *et al*., 2017) และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ผิวหนัง (Owoeye *et al*., 2010) แต่ก็มีรายงานเช่นกันว่า สารสกัดหนานเฉาเหว่ย มีความเป็นพิษเฉียบพลันน้อยหรือไม่แสดงความเป็นพิษในหนูทดลอง (Akah and Okafor, 1992 ; Ojiako and Nwanjo, 2006) สารสกัดเอทานอลจากใบมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Dégbé *et al*., 2018) สารสกัดเมทานอลจากใบ ขนาด 1,200 มก/กก ไม่ก่อให้เกิดผลที่ไม่พึงประสงค์ต่อการทำงานของตับในหนู (Akowuah *et al*., 2015) และสารสกัด ขนาดสูงถึง 5,000 มก/กก ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลัน หนูยังมีอาการปกติและไม่พบการตาย (Yeap *et al*., 2013) เนื่องจากหนานเฉาเหว่ย มีความเป็นพิษน้อย หรือไม่มีพิษเลยจึงมีความปลอดภัยในการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ (Yeap *et al*., 2010)

รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่า สารสกัดน้ำ (Adiukwu *et al*., 2013) สารสกัดอะซีโตน (Adedapo *et al*., 2014) สารสกัดเมทานอล (Samuel *et al*., 2017 ; Adeoye *et al*., 2017) และสารสกัดเอทานอล (Kola, 2007 ; Wang *et al*., 2020) จากใบ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และสาร Vernonioside V จากใบ สามารถยับยั้งสารสื่อกลาง (Pro-inflammatory cytokine) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Raw 264.7 cells) ที่ถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ได้ (Nguyen *et al*., 2020)

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเบาหวานของหนานเฉาเหว่ยว่า สารสกัดเอทานอลจากใบ (Adaramoye *et al.*, 2008) และสารที่แยกได้จากใบ ซึ่งอุดมไปด้วยสาร ฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Ebong *et al.*, 2006 ; Okoduwa *et al.*, 2020) สารสกัดเอทานอล ขนาด 400 มก/กก ที่ให้ติดต่อกันทางปาก เป็นเวลา 28 วัน สามารถลดน้ำตาลในเลือดหนูเบาหวานได้ (Ong *et al.*, 2011) น้ำต้มจากใบ สามารถลดน้ำตาลในเลือด (Erukainure *et al.*, 2019 ; Adaramoye *et al.*, 2008) ต้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง บรรเทาพยาธิสภาพที่เกิดจาก Streptozotocin (STZ) (Asante *et al.*, 2019) ฟื้นฟูความทนต่อกลูโคส (Ong *et al.*, 2011) เพิ่มระดับอินซูลิน แต่ลดความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำเลือด (Akpan and Dan, 2015) สารสกัดเมทานอล (Offor, 2015 ; Ayodele *et al.*, 2017 ; Okoduwa *et al.*, 2017 ; EjioforInnocent *et al.*, 2017 ; Adeoye *et al.*, 2017) สารสกัดน้ำจากใบ (Zakaria *et al.*, 2018 ; Osinubi,2007 ; Momoh *et al.*, 2014) ต้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง และลดน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนู ลดน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูเบาหวานในภาวะอดอาหาร และยังลดน้ำตาลในเลือดของกระต่ายได้ด้วย (Akah and Okafor, 1992) สารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ และสารสกัดบิวทานอลจากใบต้านภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Katemo *et al.*, 2018) สารสกัดน้ำจากใบที่ใช้ร่วมกับยารักษาเบาหวานเมทฟอร์มิน (Michael *et al.*, 2010) รวมทั้งสารสกัด และส่วนย่อย (Fraction) จากสารสกัด (Nwaoguikpe, 2010 ; Olufunmilayo *et al.,* 2017 ; Okoduwa *et al.*, 2017 ; Yazid *et al.*, 2020) สามารถลดน้ำตาลกลูโคสในเลือดหนูเบาหวานได้

สเตียรอยด์ (Steroid) ซาโปนิน (Saponin) และ เวอร์โนอะไมโอไซด์อี (Vernoamyoside E) (Anh *et al.*, 2021) สารสกัดฟีนอล (Saliu *et al.*, 2012) ส่วนย่อย (Fraction) (Zakariya, *et al.*, 2020) สารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดบิวทานอลจากใบ (Alara *et al.*, 2019) และชาชง (Erukainure *et al.*, 2019) ของหนานเฉาเหว่ย สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือดได้ เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) และแอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase) มีผลให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลง (Anh *et al.*, 2021)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Nitric oxide (NO) scavenging assay และการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า ในใบ (Tonukari *et al.*, 2015) ชาชงจากใบ (Erukainure *et al.*, 2019) และสารสกัดอะซีโตน (Adedapo *et al.*, 2014) ของหนานเฉาเหว่ย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดเมทานอล ยังสามารถต้านอนุมูลอิสระในหัวใจและหลอดเลือดที่เกิดจากภาวะเบาหวาน และปกป้องการถูกทำลายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากภาวะเครียดที่เป็นผลจากการมีกลูโคสในเลือดสูงได้ (Adeoye *et al.*, 2017)

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO) เป็นทั้งอนุมูลอิสระและสารสื่อกลางการอักเสบ (Inflammatory mediator) ไนตริกออกไซด์ที่มีในปริมาณสูงทำให้เกิดพยาธิสภาพในร่างกาย เช่น การขยายตัวของหลอดเลือด การอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง (Kim *et al.*, 2000 ; Tewtrakul & Itharat, 2007) การทดสอบยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์เป็นวิธีการหนึ่งที่ชี้บอกความสามารถหรือฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารทดสอบ

เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (α-Glucosidase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส เข้าสู่กระแสเลือด หากกระบวนการนี้ถูกยับยั้ง หรือเกิดขึ้นน้อยลง ก็จะส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดภายหลังรับประทานอาหาร (Post prandial) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวาน การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสเป็นวิธีหนึ่งในการศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารทดสอบ

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นโมเลกุลที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลของเซลล์ในร่างกาย อนุมูลอิสระที่มีในปริมาณมากจะเป็นอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย และอาจนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน การกำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) เป็นวิธีหนึ่งในการลดปริมาณอนุมูลอิสระ และบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบ

ปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์จากหนานเฉาเหว่ย ที่ใช้เป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ เป็นที่สนใจ และมีการจำหน่ายกันมากขึ้น แม้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของหนานเฉาเหว่ย แต่ก็ยังไม่มีการนำพืชชนิดนี้ไปพัฒนาและผลิตเป็นยารักษาโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเบาหวาน เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ชีวภาพบางอย่างยังมีน้อย ประกอบกับข้อมูลที่รายงาน ส่วนใหญ่เป็นผลจากการวิจัยในสัตว์ทดลอง และมีข้อขัดแย้งเกี่ยวกับความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (Njan *et al.*, 2008 ; Nabukenya *et al.*, 2014 ; Okwuzu *et al.*, 2017 ; Ojiako and Nwanjo, 2006 ; Dégbé *et al.*, 2018 ; Akowuah *et al.*, 2015 ; Yeap *et al.*, 2013) ตลอดจนกลไกการออกฤทธิ์ ชนิดของสารออกฤทธิ์ยังมีไม่มากนัก งานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพื่อให้ทราบชนิดของสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์

และศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัยต่อการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการทำงานของเอนไซม์แอลฟากูล-โคซิเดส รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีศึกษา

1. พืชที่ใช้ในการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ ใบหนานเฉาเหว่ย (***Vernonia amygdalina* Del.)** ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.อารี ทองฤทธิ์ ตำบลคลองห้า อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

เก็บรวบรวมใบหนานเฉาเหว่ย จากแปลงปลูกหนานเฉาเหว่ย ที่อยู่ในสวนสมุนไพรบ้านอารี ตำบลคลองห้า อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี โดยเก็บใบในระยะใบเพสลาด คือ ใบที่ไม่แก่และไม่อ่อนจนเกินไป มีลักษณะสมบูรณ์ ปราศจากโรค และแมลงทำลาย จากต้นพืช ซึ่งปลูกด้วยดินจากเชิงเขาในเขตอำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก ที่ผสมดินด้วยปุ๋ยหมักจากเศษใบไม้และขี้เถ้าแกลบ ต้นพืชได้รับการปลูก และการดูแลในสภาพกึ่งธรรม คือ ให้ได้รับแสงแดด และอุณหภูมิในสภาพแวดล้อมทั่วไป ปราศจากการใช้สารเคมี มีการรดน้ำพรวนดิน ให้ปุ๋ยจากน้ำหมักอินทรีย์ ตามความเหมาะสมต่อการเจริญของพืช เก็บใบพืชให้ได้ปริมาณเพียงพอในครั้งเดียวจากต้นพืชที่ปลูกคราวเดียวกัน ที่มีอายุประมาณ 1 ปี จำนวนหลายต้น โดบเก็บในช่วงเช้าก่อนแดดออก ในวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2564 ตัวอย่างพืช ได้ผ่านการตรวจสอบลักษณะพันธุ์พืช โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนอง จอมเกาะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตัวอย่างพรรณไม้แห้ง เลขรหัส BNOP/BIO/VA-001 เก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

2. การเตรียมสารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ย

นำใบหนานเฉาเหว่ยที่รวบรวมได้ มาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง เพื่อให้สะอาด และเป็นการขจัดสิ่งปนเปื้อน หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งในที่ร่มให้แห้งพอประมาณ จากนั้น นำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง แล้วนำมาบด ร่อนผ่านตะแกรง นำผงที่ได้ไปทำการสกัดตามวิธีการของ Buddhakala & Talubmook, (2020) โดยการหมัก (Maceration) ในตัวทำละลาย คือ เอทานอล 95% ในอัตราส่วนของผงใบหนานเฉาเหว่ย 400 กรัม: ต่อเอทานอล 1 ลิตร หมักส่วนผสมนี้ไว้ในโหลแก้ว เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด กรองส่วนผสมโดยใช้กระดาษกรอง No.1 (Whatman International Ltd.) เพื่อแยกกากออก นำส่วนที่กรองได้มาทำการระเหย เพื่อกำจัดตัวทำละลาย โดยใช้เครื่อง Rotary evaporator จนกระทั่งได้ส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract) คำนวณหาร้อยละของสารสกัด (% Yield) จากน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (105.22 กรัม) และน้ำหนักผงใบพืชที่นำมาสกัด (973.34 กรัม) ซึ่งได้ค่า % Yield เท่ากับ10.81% บรรจุสารสกัดที่ได้ในภาชนะที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4ºC เพื่อรอการนำไปใช้ต่อไป

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำสารสกัดที่ได้ ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS) โดยส่งตรวจวิเคราะห์ ณ สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ ชั้น 1 อาคารบริหารวิชาการรวม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา การตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS ในครั้งนี้ ใช้แก๊สฮีเลียม 99.99% เป็นตัวพา และคอลัมน์ที่ใช้ คือ Agilent- CP9205 VF-WAXms (30 mx 0.25 มล x 0.25 มล) ที่มีอัตราการไหล 1 มล/นาที โดยมีอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ที่ 45ºC เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 4.5 ºC/นาที จนถึง 250ºC แล้วจึงฉีดสารทดสอบ สำหรับส่วนMass Spectrometer มีอุณหภูมิของแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนที่ 230 ºC และอุณหภูมิส่วนคัดแยกที่ 150 ºC พลังงานของอิเล็กตรอนที่วิ่งชนโมเลกุลของสารเท่ากับ 70 eV ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Wiley และ National Institute of Science and Technology library

4. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (RAW 264.7 macrophages) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Lipopolysaccharide (LPS ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) สำหรับเซลล์ใช้ คือ เซลล์ RAW 264.7 ซื้อจาก the American Type Culture Collection, ATCC®TIB-71™ สหรัฐอเมริกา เลี้ยงเซลล์ในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, ATCC® 30-2002™ USA) ที่เสริมด้วย 5% Fetal bovine serum และ1% Antibiotics, Penicillin-Streptomycin

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในขวดรูปชมพู่ (Flask) และบ่มในตู้บ่ม (5%CO_2 Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเดิมออก และล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสำเร็จรูป (DMEM+10%FBS+1%P/S) หลังจากนั้น ทำให้เซลล์กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ อย่างสม่ำเสมอ นับจำนวนเซลล์ที่ได้สำหรับใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และการยับยั้งการผลิตไนตริคอ-อกไซด์ โดยทำการเจือจางเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 1x10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ในจานหลุมเพาะเลี้ยง (96-well plate) ในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย ด้วยวิธี 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Threrapanithan *et al*., (2015) และ Bahuguna *et al*., (2017) โดยนำสารสกัดใบมาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างด้วย Phosphate buffer solution (PBS) จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รวมถึงสารละลายควบคุมเชิงบวก (Dimethyl sulfoxide, DMSO) และเชิงลบ (Blank) ลงในหลุมเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัด นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม และอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 150 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2-4 ชั่วโมง ดูดสารละลายในจานเพาะเลี้ยงทิ้ง เติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อล้างตะกอน จากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) จากสมการ

นำสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ สูงกว่า 80% ใช้ในการศึกษาการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

5. การทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

ทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณไนไตร์ท (Nitrite) ด้วยชุด Griess Reagent kit โดยเตรียมสารมาตรฐาน (Nitrite standard) ที่ทำให้เจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากนั้น นำสารละลาย Sulfanilamide N-1-Napthylethylenediamine dihydrochloride (NED) เติมลงในสารมาตรฐาน และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการสัมผัสสารสกัด หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-10 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ จากสมการ

$OD_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

คำนวณหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ แล้วเปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ Diclofenac

6. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

ทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ด้วยวิธี p-Nitrophenol colorimetric ในการทดลองนี้ใช้ p-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranosidae (PNP-G) เป็นสับสเตรท (Substrate) เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) กับ PNP-G ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และ p-Nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายใส สีเหลือง ทำการทดสอบด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dong *et al*., (2012) โดยผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.094, 0.47 และ 0.023 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.1 M, pH 6.8 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (Baker's yeast α-glucosidase) ความเข้มข้น 0.06 หน่วย (unit) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 1.3 mM p-PNP-G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม Na_2CO_3 ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 160 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UVM 340 Microplate Reader โดยใช้ยาอะคาโบส (Acarbose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) คำนวณหาค่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (% α-glucosidase inhibition) จากสมการ

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

คำนวณหาค่า IC_{50} หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ร้อยละ 50) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส เปรียบเทียบกับฤทธิ์ของยา Acarbose

7. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย โดยวิธี 2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Villano *et al.*, (2007) คือ เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารทดสอบ (สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย และสาร Butylated hydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้น 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 และ 0.0125 มิลลิกรัม/1.5 มิลลิลิตร นำสารทดสอบแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมลงในหลุมของจานทดสอบ (96-well plate) แล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปล่อยไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UVM 340 Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH scavenging) โดยใช้สมการ

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

คำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าสถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ค่าร้อยละ ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (Mean±SEM) การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่างจากข้อมูลตามแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

8.1 คำนวณหาร้อยละในการมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) นำเสนอแบบกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 cells

8.2 นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมและชุดทดสอบไปคำนวณหาค่าร้อยละในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และหาค่า IC_{50} จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับค่าร้อยละในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ แล้วเปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ Diclofenac ด้วยสถิติทดสอบแบบ Student-t test

8.3 คำนวณหาค่าร้อยละในการกำจัดอนุมูล DPPH และคำนวณหาค่า IC_{50} จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel แล้วเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสาร BHT ด้วยสถิติทดสอบแบบ Student-t test

8.4 คำนวณหาค่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และหาค่า IC_{50} จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส แล้วเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของยา Acarbose ด้วยสถิติทดสอบแบบ Student-t test

8.5 ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance ; One-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Least significant difference (LSD), Student-t test และ Duncan multiple range test (DMRT) หาค่าความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS กำหนดค่าความเชื่อมั่นทางสถิติที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย ด้วยเครื่อง GC-MS พบสารสำคัญที่สามารถบอกชนิดได้จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ Benzoic acid, Neophytadiene, Xylocaine, Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ether, Phytol, (z,z) -9,12-Octadecadienoic acid, (z,z,z) -9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (z,z,z) -9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester และ Octadecanoic acid มีรายละเอียดของสารแต่ละชนิด ดังแสดงใน Table 1 และ Figure 1

การศึกษาจากเอกสาร พบว่า n-Hexadecanoic acid เป็นกรดไขมันอิ่มตัว มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ (Vasudevan *et al.*, 2012 ; Ponnamma *et al.*, 2012 ; Ruvanthika, Manikandan & Lalitha, 2016 ; Chitra and Karthikeyan, 2018) Phytol เป็นสารประกอบเทอร์ปีนมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง (Santos *et al.*, 2013 ; Costa *et al.*, 2016 ; de Moraes *et al.*, 2014 ; Rye *et al.*, 2011 ; Islam *et al.*, 2020 ; Silva *et al.*, 2014 ; Harish *et al.*, 2021 ; Chitra & Karthikeyan, 2018) 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)-เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็น มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Gunasekarana, *et al.*, 2013) และ 9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z) -เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว และเป็นกรดไขมัน

ชนิดที่จำเป็น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (Barre, 2017 ; Blondeau *et al.*, 2014) การพบสารเหล่านี้ในสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย จึงแสดงให้เห็นว่า ส่วนหนึ่งของสารสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มีส่วนทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการวิจัยในครั้งนี้ สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Alara *et al.*, (2017) ที่วิเคราะห์สารสกัดหนานเฉาเหว่ยด้วย GC-MS พบว่า สารสกัดหนานเฉาเหว่ย ประกอบด้วยสารเคมีหลัก 11 ชนิด ประกอบด้วย Phytol (43.69%), (z,z,z) -Methyl ester-9,12,15-Octadecatrienoic acid (17.60%), 2-Methyl-3-hexanol (6.83%), Ethyl ester-9,12-octadecadienoic acid (6.07%), Ethyl ester linoleic acid (5.19%), Ethyl ester hexadecanoic acid (5.06), Heneicosane (4.15%), Heptacosane (3.25%) และสารอื่นๆ น้อยกว่า 3%

อย่างไรก็ตาม ชนิดของสารเคมีที่พบในสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยในการศึกษาครั้งนี้ แตกต่างจากที่ Dégbé *et al.*, (2018) ที่ได้รายงานไว้ ว่าสารสกัดเอทานอล และสารสกัดไฮโดรเอทานอลใบหนาน-เฉาเหว่ยมี ฟีนอล (Phenols) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งทำการวิเคราะห์ Total phenols โดยใช้วิธี Folin-Ciocal-teu method และวิเคราะห์ Total Favonoids โดยวิธี Aluminium chloride colorimetric method และงานวิจัยของ Usunomena & Ngozi (2016) ที่วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพฤษเคมี (Phytochemical screening) พบว่า ในสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มี ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ซาโปนิน (Saponins) แทนนิน (Tannins) ไตรเทอร์ปีนอยด์ (Triterpenoids) สเตียรอยด์ (Steroids) น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) และไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) แต่ไม่มี แอนทราควิโนน (Anthraquinones)

2. ความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย โดยวิธี MTT assayพบว่า หลังจากเซลล์ RAW 264.7 ได้สัมผัสกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ เป็น 102.93± 1.67, 104.25± 2.89, 85.87±3.92, 34.33±2.23, 5.59±0.13 และ 5.48±0.03 % ตามลำดับ

Table 1 Major identifiqed chemical constituents of ethanol leaf extract from *V. amygdalina* (LEVA)

GC Peak No.	Component RT	Compound Name	Formula	% Area
1	4.25	Benzoic acid	C_6H_5COOH	0.92
2	12.24	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	3.60
3	13.30	Xylocaine	$C_{14}H_{22}N_2O$	0.72
4	13.83	Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	14.08
5	14.18	Hexadecanoic acid,ethyl ether	$C_{18}H_{36}O_2$	5.67
6	15.82	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	30.80
7	16.16	(z,z) -9,12-Octadecadienoic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	1.71
8	16.26	(z,z,z) -9,12,15-Octadecatrien-1-ol	$C_{18}H_{32}O$	14.50
9	16.57	(z,z,z) -9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester	$C_{18}H_{30}O_2$	7.14
10	16.49	Octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	3.59

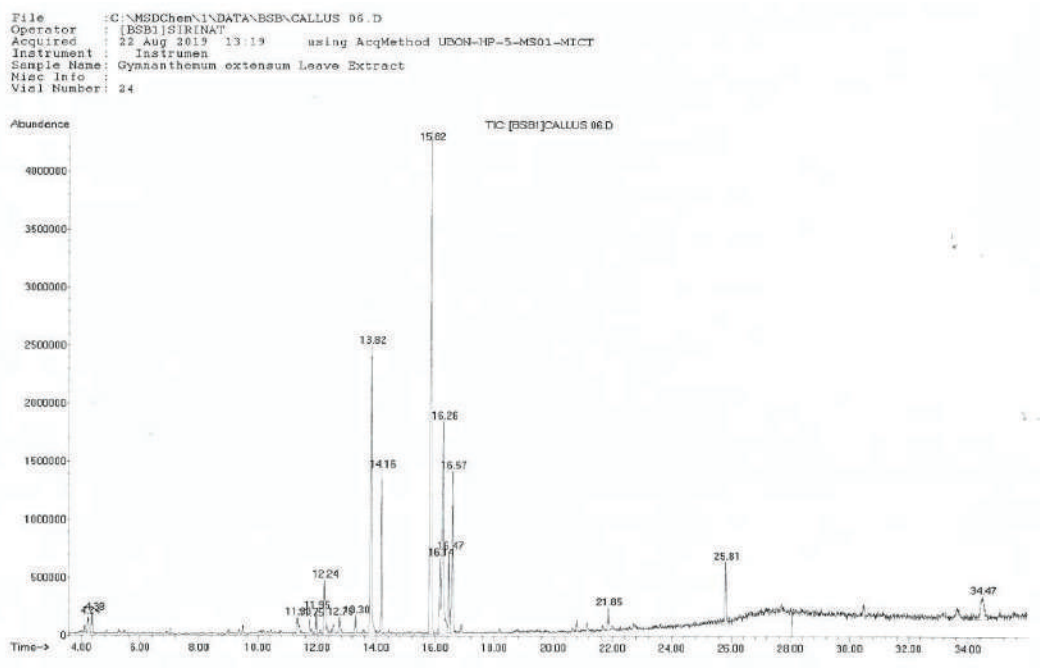

Figure 1 GC/MS chromatogram of chemical constituents of ethanol leaf extract from *V. amygdalina* (LEVA)

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ แปรผกผันกับความเข้มข้นของสารสกัด จะเห็นได้ว่า สารสกัดสารสกัดที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 คือ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Figure 2) สารสกัดทำให้มีอัตราการรอดชีวิตกึ่งหนึ่ง (IC_{50}) มีค่าเป็น 110.02±0.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Figure 3) สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตรอดสูงกว่า 80% จึงถูกนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษของหนานเฉาเหว่ยทั้งที่สอดคล้องและขัดแย้งกับผลการวิจัยในครั้งนี้ นักวิจัยกลุ่มหนึ่ง พบว่า หนานเฉาเหว่ยไม่แสดงความเป็นพิษเลย ไม่ก่อให้เกิดพิษหรือฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ หรือมีความเป็นพิษน้อย (Akah and Okafor, 1992 ; Njan *et al.*, 2008 ; Ojiako and Nwanjo, 2006 ; Akowuah *et al.*, 2015 ; Dégbé *et al.*, 2018 ; Yeap *et al.*, 2013) จึงมีความปลอดภัยในการนำหนานเฉาเหว่ยไปใช้เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ (Yeap *et al.*, 2010) ขณะที่นักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่ง พบว่า หนานเฉาเหว่ยมีความเป็นพิษ มีผลให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับ และระดับคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้น เป็นพิษต่อหนูถีบจักร ก่อให้เกิดการแตกของโครโมโซม และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ผิวหนัง (Nabukenya *et al.*, 2014 ; Ibrahim *et al.*, 2011 ; Owoeye *et al.*, 2010) ผลจากการทดสอบครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และความเป็นพิษผันแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ดังนั้นจึงควรระวังในการใช้หนานเฉาเหว่ยในปริมาณมาก

3. การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

การทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 13.78±2.07, 17.39±2.41 และ 29.97±2.58 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้น้อยกว่ายา Diclofenac ที่สามารถยับยั้งได้ถึง 27.07±1.81% (Table 3)

เนื่องจากไนตริกออกไซด์ (NO) เป็นสารสื่อกลาง (Mediator) ที่สำคัญที่มีบทบาทในการก่อการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายเกิดการอักเสบ จะส่งผลให้ปริมาณ NO เพิ่มมากขึ้น การวิจัยในครั้งนี้ สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผลการวิจัยในครั้งนี้ สอดคล้องกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า ใบ รวมทั้งสารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Adiukwu, *et al.*, 2013 ; Adedapo *et al.*, 2014 ; Samuel *et al.*, 2017 ; Kola, 2007 ; Wang *et al.*, 2020)

Samuel *et al.*, (2017) พบว่า กลไกในการต้านการอักเสบของสารสกัด คือ ลดการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่มีการอักเสบและลดออกซิเดชั่นของไขมัน การวิจัยครั้งนี้ สารสกัดเอ-ทานอลใบหนานเฉาเหว่ย ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

ผลจากการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดมีมีศักยภาพในการต้านการอักเสบต่ำกว่า ยา Diclofenac ดังนั้นหากจะประยุกต์ใช้หนานเฉาเหว่ยในการรักษาอาการอักเสบจึงควรเลือกใช้ในกรณีที่มีการอักเสบไม่มาก และไม่ควรใช้ปริมาณมาก เพราะอาจเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

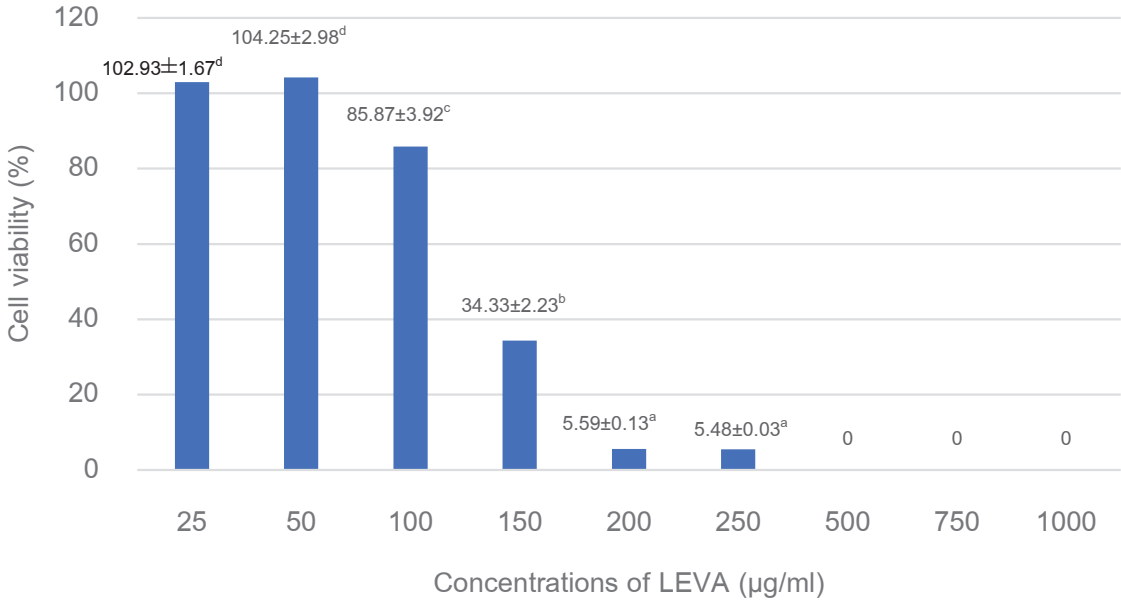

Figure 2 Cell viability (%) of RAW 264.7 cells exposed to ethanol leaf extract from *V. amygdalina* (LEVA)

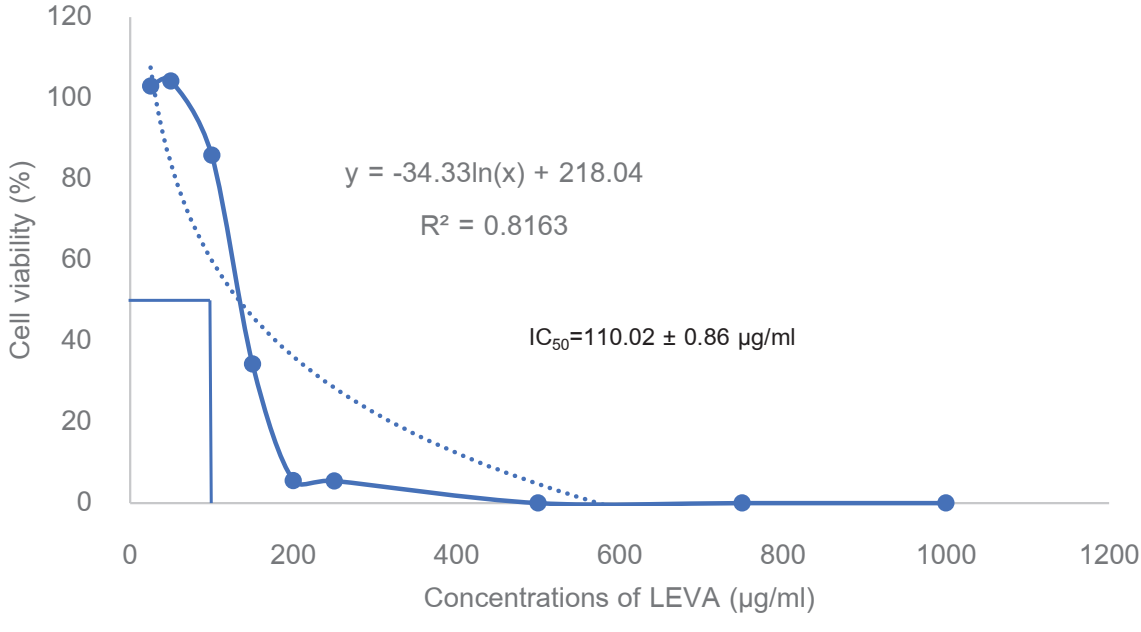

Figure 3 Cell viability (LC_{50}) of RAW 264.7 cells exposed to ethanol leaf extract from *V. amygdalin* (LEVA)

Table 2 Inhibitory effect of ethanol leaf extract from *V. amygdalina* (LEVA) and Diclofenac on NO production (%) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

Concentrations (µg/mL)	% Inhibition NO production	
	LEVA	Diclofenac
25	13.78±2.07[a]	-
50	17.39±2.41[a*]	27.07±1.81[**]
100	29.97±2.58[b]	-

Values are expressed as means ±S.E.M, n= 3 replications ; There was significant difference between means have the different alphabetical super-scripts ($p<0.05$) (a and b by least significant difference (LSD), * and ** by Student-t test).

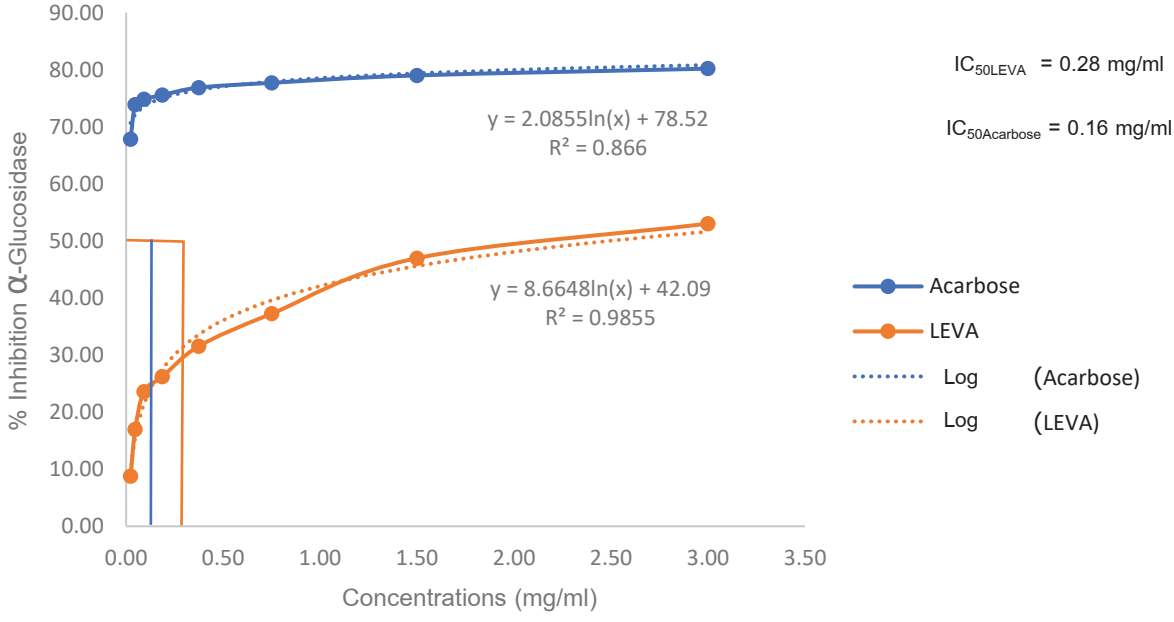

Figure 4 Inhibitory effect of ethanol leaf extract from *V. amygdalina* (LEVA) and Acarbose on α-Glucosidase activity

4. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา -กลูโคซิเดส

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส พบว่า สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ และการยับยั้งผันแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 3.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ 53.02±0.00% และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.28 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ยา Acarbose ยับยั้งได้สูงถึง 80.19±0.01% และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Figure 4) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย ในการวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับการวิจัยของ Erukainure *et al.*, (2019) ; Alara *et al.*, (2019) ; Saliu *et al.*, (2012) ; Anh *et al.*, (2021) และ Zakariya, *et al.*, (2020) ที่พบว่า ชาชงหนานเฉาเหว่ย สารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดบิวทานอล สารสกัดฟีนอล ส่วนสกัดย่อยสเตียรอยด์ ซาโปนิน รวมทั้งสาร Vernoamyoside E ที่แยกได้จาก สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase และ α-glucosidase อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ของสารทดสอบในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส หรือฤทธิ์ต้านเบาหวาน ขึ้นอยู่กับปัจจัยในการทดสอบ เช่น ขนาดของสารสกัด ระยะเวลาในการให้สารสกัด (Ong *et al.*, 2011) และชนิดของสารสกัด (Atangwho *et al.*, 2013) สารสำคัญ (Active compounds) เช่น Polyphenol เป็นปัจจัยที่หนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ต้านเบาหวานของหนานเฉาเหว่ย (Ong *et al.*, 2011)

เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ย่อยแป้ง และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส การวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดเอทานอล

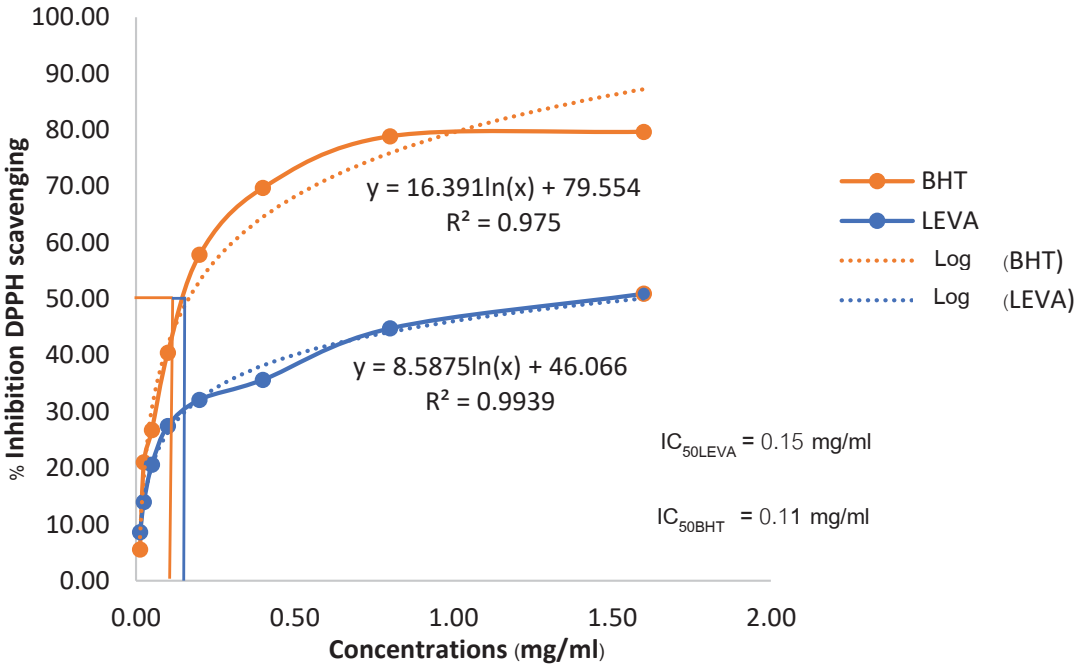

Figure 5 Antioxidant activities of ethanol leaf extract from *V. amygdalina* (LEVA) and BHT, using DPPH assay

ใบหนานเฉาเหว่ย ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ ดังนั้น สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ยจึงออกฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยการชะลอการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด และชะลอการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือด

ผลจากการทดสอบนี้ ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดมีศักยภาพในการต้านเบาหวานต่ำกว่ายา Acarbose ที่ใช้สำหรับผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้น หากจะมีการใช้ในการรักษาเบาหวาน ควรจะนำไปใช้ร่วมกับยารักษาโรคเบาหวาน ไม่ควรใช้หนานเฉาเหว่ยอย่างเดียวในปริมาณมาก ซึ่งอาจเกิดอันตราย เนื่องจากสารสกัดจะมีพิษมากขึ้นเมื่อใช้ในปริมาณที่มากขึ้น

5. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 และ 0.01 มก/มล สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ยสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ 50.93±0.01, 44.77±0.02, 35.67±0.00, 32.12±0.01, 27.45±0.00, 20.62±.0.01, 14.00±0.01 และ 8.60±0.01 % ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ สาร BHT กำจัดอนุมูล DPPH ได้ 79.68±0.01, 78.88±0.01, 69.73±0.02, 57.84±0.02, 40.47±0.01, 26.73±0.02, 21.04±0.01 และ 5.57±0.01% ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 1.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50.93±0.01% ซึ่งกำจัดอนุมูล DPPH ได้น้อยกว่าสาร BHT ที่กำจัดอนุมูลอิสระได้ถึง 79.68± 0.01% (Figure 5) ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และออกฤทธิ์โดยวิธีกำจัดอนุมูล DPPH ผลการวิจัยในครั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Tonukari *et al.*, 2015 ; Erukainure *et al.*, 2019 ; Adedapo *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2020 ; Adeoye *et al.*, 2017 ; Dégbé *et al.*, 2018) ที่รายงานว่า ชาชง สารสกัดอะซีโตน สารสกัดน้ำ สารสกัดเมทานอล และสารสกัดเอทานอลจากใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหนานเฉาเหว่ยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของสารสกัด หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร (Atangwho *et al.*, 2013) ความเข้มข้นหรือขนาดของสารสกัดที่ใช้ และปริมาณของสาร ฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัด (Alara *et al.*, 2019)

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มีสารเคมีหลักเป็นองค์ประกอบ 10 ชนิด ได้แก่ Benzoic acid, Neophytadiene, Xylocaine,Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid ethyl ether, Phytol, (z,z) -9,12-Octadecadienoic acid, (z,z,z) -9,12, 15-Octadecatrien-1-ol, (z,z,z) -9,12,15-Octadecatrienoic acid ethyl ester และ Octadecanoic acid สารสกัดเป็นพิษต่อ

เซลล์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 110.02±0.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ มีฤทธิ์ต้านเบาหวานและออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส สารสกัดยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์โดยการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ นอกจากนี้ สารสำคัญส่วนหนึ่งที่พบในสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มีส่วนในการออกฤทธิ์ของสารสกัด

พบว่า สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านเบาหวาน และต้านอนุมูลอิสระ จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดนี้ไปทำการวิจัยหรือทดลองต่อทางคลินิก เพื่อเป็นแนวทางไปสู่การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในการรักษาโรคที่สัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ รวมทั้งโรคเบาหวาน และการอักเสบ อย่างไรก็ตาม สารสกัดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น การใช้หนานเฉาเหว่ยจึงต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ธนากรณ์ ดำสุด ฐิติกร จันทร์วุ่น นฤมล ศรีเมฆ และสุธรรม ส่งแสง. (2560). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสของส่วนสกัดขนุนอ่อน. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น, 45* (3), 543-550.

ศรีสมพร ปรีเปรม. [ม.ป.ป.]. *การศึกษาด้านเภสัชเวทของหนานเฉาเหว่ย*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=arti.

Abebe, W. (1984). Traditional pharmaceutical practice in Gondar region, Northwestern Ethiopia. *Journal of Ethnopharmacology, 11* (1), 33-47.

Adaramoye, O.A., Akintayo, O., Achem, J., & Fafunso, M.A. (2008). Lipid-lowering effects of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* leaves in rats fed on high cholesterol diet. *Vascular health and Risk Management, 4* (1), 235.

Adedapo, A.A., Aremu, O.J., & Oyagbemi, A.A. (2014). Anti-oxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of the acetone leaf extract of *Vernonia amygdalina* in some laboratory animals. *Advanced Pharmaceutical Bulletin, 4* (Suppl 2), 591.

Adeoye, A.T., Ajibade, T.O., Oyagbemi, A.A., Omobowale, T.O., Adedapo, A.D., Ayodele, A.E.,... & Adedapo, A.A. (2017). The methanol leaf extract of *Vernonia amygdalina* ameliorates cardiomyopathy in alloxan-induced diabetic rats. *Ornamental and Medicinal Plants, 1* (2), 26-48.

Adiukwu, P.C., Kayanja, F.I.B., Nambatya, G., Adzu, B., Twinomujuni, S., Twikirize, O., ... & Buzaare, P. (2013). Anti-Inflammatory and anti-pyretic activity of the leaf, root and saponin fraction from *Vernonia amygdalina*. *British Journal of Pharmacology and Toxicology, 4* (2), 33-40.

Akah, P.A., & Okafor, C.L. (1992). Blood sugar lowering effect of *Vernonia amygdalina* Del, in an experimental rabbit model. *Phytotherapy Research, 6* (3), 171-173.

Akowuah, G.,I Lee, L. & Chin, H. (2015). *Toxicological evaluation of Vernonia amygdalina methanol leave extract in rats*. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 15.10.1007/ s13596-015-0194-6.

Akpan, H.D. & Dan, P.H. (2015). Antidiabetic potential of diets containing *Vernonia amygdalina* leaves in Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *International Journal of Current Research, 7*, (5),15963-15968.

Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Mudalip, S.A., & Olalere, O.A. (2019). Effect of drying methods on the free radicals scavenging activity of *Vernonia amygdalina* growing in Malaysia. *Journal of King Saud University-Science, 31* (4), 495-499.

Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Ukaegbu, C.I., & Kabbashi, N.A. (2019). Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. *Journal of Taibah University for Science, 13* (1), 414-422.

Anh, H.L.T., Vinh, L.B., Lien, L.T., Cuong, P.V., Arai, M., Ha, T.P., ... & Kim, Y.H. (2021). In vitro study on α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of a new stigmastane-type steroid saponin from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Natural Product Research, 35* (5), 873-879.

Asante, D.B., Henneh, I.T., Acheampong, D.O., Kyei, F., Adokoh, C.K., Ofori, E.G.,... & Ameyaw, E.O. (2019). Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic activity of young and old leaves of *Vernonia amygdalina. Journal of Biomedicine and Pharmacotherapy, 111*, 1187-1203.

Atangwho, I.J., Ebong, P.E., Eyong, E.U., Asmawi, M.Z., & Ahmad, M. (2012). Synergistic antidiabetic activity of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica*: Biochemical effects and possible mechanism. *Journal of Ethnopharmacology, 141* (3), 878-887.

Atangwho, I.J., Egbung, G.E., Ahmad, M., Yam, M.F., & Asmawi, M.Z. (2013). Antioxidant versus anti-diabetic properties of leaves from *Vernonia amygdalina* Del. *growing in Malaysia. Food chemistry, 141* (4), 3428-3434.

Ayodele, A., Adeoye, A.T., Adedapo, A.D., Omobowale, T.O., Adedapo, A.A., & Oyagbemi, A.A. (2017). Antidiabetic and antioxidant activities of the methanol leaf extract of *Vernonia amygdalina* in alloxan-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Medicinal Plants for Economic Development, 1* (1), 1-12.

Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V.K., & Kang, S.C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, *12*, 115-118.

Barre, D.E. (2007). The Role of consumption of alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in human metabolic syndrome and Type 2 diabetes--A mini-review. *Journal of Oleo Science, 56* (7), 319-325.

Blondeau, N., Lipsky, R.H., Bourourou, M., Duncan, M.W., Gorelick, P.B. & Marini, A.M. (2014). Alpha-linolenic acid: An omega-3 fatty acid with neuroprotective properties—Ready for use in the stroke clinic. *International Journal of Biomedical Researchl*, *2015*, 1-8.

Buddhakala, N., & Talubmook, C. (2020). Toxicity and antidiabetic activity of ethanolic extract of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski flower in rats. *Journal of Ethnopharmacology, 262*, 113-128.

Chitra, S. & Karthikeyan, J. (2018). Phytochemical profiling of cat whisker's (*Orthosiphon stamineus*) tea leaves extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7* (6), 1396-1402.

Costa, J.P., Islam, M.T., Santos, P.S., Ferreira, P.B., Oliveira, G.L., Alencar, M.V., Paz, M.F., Ferreira, É.L., Feitosa, C.M., Citó, A.M., Sousa, D.P., Melo-Cavalcante, A.A. (2016). Evaluation of antioxidant activity of phytol using non- and pre-clinical models. *Current Pharmacology and Biotechnology, 17* (14), 1278-1284.

Dégbé, M., Debierre-Grockiego, F., Tété-Bénissan, A., Débare, H., Aklikokou, K., Dimier-Poisson, I., & Gbeassor, M. (2018). Extracts of *Tectona grandis* and *Vernonia amygdalina* have anti-toxoplasma and pro-inflammatory properties in vitro. *Parasite*, 25.

de Moraes, J., de Oliveira, R. N., Costa, J. P., Junior, A.L., de Sousa, D.P., Freitas, R.M.,... & Pinto, P.L. (2014). Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. *PLoS neglected tropical diseases, 8* (1), e2617.

Dong, H.Q., Li, M., Zhu, F., Liu, F.L., & Huang, J.B. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd against α-glucosidase and α-amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry, 130*, 261-266.

Ebong, P.E., Atangwho, I.J., Eyong, E.U., Ukwe, C., & Obi, A.U. (2006, November). Pancreatic Beta cell regeneration: a probable parallel mechanism of hypoglycaemic action of *Vernonia amygdalina* Del and Azadirachta indica. In *the Proceeding of the 2006 International Neem Conference* (pp. 83-89).

Ejioforinnocent, M.I., Zaman, M.K., & Das, A. (2017). Antidiabetic evaluations of different parts of *Vernonia amygdalina*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS), 12* (4), 23-28.

Elaby, S.M., & Ali, J.B. (2018). The anti-anemic effect of dried beet green in phenylhydrazine treated rats. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University, 2* (2), 54-69.

Erukainure, O.L., Chukwuma, C.I., Sanni, O., Matsabisa, M.G., & Islam, M.S. (2019). Histochemistry, phenolic content, antioxidant, and anti-diabetic activities of *Vernonia amygdalina* leaf extract. *Journal of Food Biochemistry, 43* (2), e12-737.

Erukainure, O.L., Oyebode, O.A., Ibeji, C.U., Koorbanally, N.A., & Islam, M.S. (2019). *Vernonia amygdalina* Del. stimulated glucose uptake in brain tissues enhances antioxidative activities ; and modulates functional chemistry and dysregulated metabolic pathways. *Metabolic Brain Disease, 34* (3), 721-732.

Farombi, E.O., & Owoeye, O. (2011). Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and Garcinia biflavonoid. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 8* (6), 2533-2555.

Gunasekarana, S., Vijay, T., Sarumathyd, K., Palanie, S., Panneerselvamb, R.P.S., & Srinivasanba, V. (2013). Phytoconstituents evaluation by GC-MS and therapeutic efficacy of Grewia umbellifera on Streptozotocin (STZ) induced diabetic. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences, 4*, 2380-2386.

Hamman, L.L., Amaza, D.S., Zirahei, J.V., Goji, A.D.T., Mari, H., & Amali, F. (2016). Effect of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) on phenylhydrazine induced kidney damage in albino rat. *International Journal of Advanced Research, 4* (11), 39-47 IJAR.

Harish, C., Upadhyay, Mishra, A., Pandey, J., Sharma, P., Tamrakar, A.K., Srivastava, A.K., Khan F., & Srivastava, S.K. (2021). In vitro, in vivo and in silico antihyperglycemic activity of some semi-synthetic phytol derivatives. *Medicinal Chemistry, 17*. DOI: https:// doi.org/ 10.2174/ 1573406417666201216124018

Hutchioson & Dalzell J.M. (1963). *Flora of West Africa* (2nd edition). agent London, pp 450-455.

Ibrahim, G., Abdurahman, E.M., Ibrahim, H., Ibrahim, N., & Magaji, M.G. (2011). Toxicity and analgesic effects of *Vernonia amygdalina* Del. *(Asteraceae) leaf extract on mice. Intnational Journal of Advanced Pharmacology and Biological Sciences, 1*, 1-4.

Igile, G.O., Oleszek, W., Jurzysta, M., Burda, S., Fafunso, M., & Fasanmade, A.A. (1994). Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42* (11), 2445-2448.

Ijeh, I.I., & Ejike, C.E. (2011). Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Medicinal Plants Research, 5* (7), 1051-1061.

Islam, M.T., Ayatollahi, S.A., Kabir Zihad, S.M.N., Sifat, N., Khan,M.R., Arkajyoti P., Salehi, B., Islam, T., Mubarak, M.S., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2020). Phytol anti-inflammatory activity: Pre-clinical assessment and possible mechanism of action elucidation. *Cell Molecular Biology, (Noisy-le-grand), 25, 66* (4), 264-269.

Katemo, F.M., Marini, R.D., & Kadima, J.N. (2018). Antihyperglycemic Activity of *Vernonia amygdalina* leaf extracts, Hibiscus esculentus fruit extract and Garcinia kola seed extract from Kisangani Plants. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 1-8.

Kim, N.Y., Kang, T.H, Song, E.K., Pae, H.O., Chung, H.T., & Kim, Y.C. (2000). Inhibitory effects of butanol fraction of the aqueous extract of Forsythia koreana on the nitric oxide production by murine macrophage-like RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology, 73*, 323-327.

Kaur, D., Kaur, N., & Chopra, A. (2019). A comprehensive review on phytochemistry and pharmacological activities of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8* (3), 2629-2636.

Kola, O.M. (2007). Anti-inflammatory activity of ethanolic leaf extract from *Vernonia amygdalina* on the immune system of Swiss albino rats dosed with Clostridium sporogenes (NC13532). *Research Journal of Medical Sciences, 1* (2), 127-31.

Michael, U.A., David, B.U., Theophine, C.O., Philip, F.U., Ogochukwu, A.M., & Benson, V.A. (2010). Antidiabetic effect of combined aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina* and metformin in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 1* (3), 197.

Momoh, M.A., Adedokun, M.O., Mora, A.T., & Agboke, A.A. (2014). Antidiabetic activity and acute toxicity evaluation of aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina*. *African Journal of Biotechnology, 13* (50), 4586-4593.

Nabukenya, I., Rubaire-Akiiki, C., Mugizi, D., Kateregga, J., & Olila, D. (2014). Sub-acute toxicity of aqueous extracts of Tephrosia vogelii, *Vernonia amygdalina* and *Senna occidentalis* in Rats. *Natural Product Research, 2*, 143. doi: 10.4172/2329-6836.1000143 Page 2 of 5 acute study.

In the protocol. OECD test guidelines were followed. National Academies guide for the care and use of laboratory animals were adapted for the animal protocol in this study and was approved by the institutional review board (study number IRBCO-VAB/2013/009). *Briefly, 100*, 70-100.

Nguyen, T.X.T., Dang, D.L., Ngo, V.Q., Trinh, T.C., Trinh, Q.N., Do, T.D., & Thanh, T.T.T. (2020). Anti-inflammatory activity of a new compound from *Vernonia amygdalina. Natural Product Research*, 1-6.

Njan, A.A., Adzu, B., Agaba, A.G., Byarugaba, D., Díaz-Llera, S., & Bangsberg, D.R. (2008). The analgesic and anti-plasmodial activities and toxicology of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Medicinal Food, 11* (3), 574-581.

Nwaoguikpe, R.N. (2010). The effect of extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) on blood glucose levels of diabetic rats. *International Journal of Biological and Chemical Sciences, 4* (3).

Offor, C.E. (2015). Comparative anti-diabetic effects of the ethanol leaf extracts of *Vernonia amygdalina* and Azadirachta indica in albino rats. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4* (1), 201-209.

Ojiako, O.A., & Nwanjo, H.U. (2006). Is *Vernonia amygdalina* hepatotoxic or hepatoprotective? Response from biochemical and toxicity studies in rats. *African Journal of Biotechnology, 5* (18).

Okoduwa, S.I.R., Umar, I.A., James, D.B., & Inuwa, H.M. (2017). Validation of the antidiabetic effects of *Vernonia amygdalina* Delile leaf fractions in fortified diet-fed streptozotocin-treated rat model of type-2 diabetes. *Journal of Diabetology, 8* (3), 74.

Okoduwa, S.I., Umar, I.I.A., James, D.B., Inuwa, H.M., Habila, J.D., & Venditti, A. (2020). Bioguided fractionation of hypoglycaemic component in methanol extract of *Vernonia amygdalina*: an in vivo study. *Natural Product Research*, 1-5.

Okwuzu, J.O., Odeiga, P., Otubanjo, O.A., & Ezechi, O.C. (2017). Cytotoxicity testing of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.) and sniper 1000EC (2, 3 dichlorovinyl dimethyl phosphate) using the Alium cepa test. *African Health Sciences, 17* (1), 147-153.

Olufunmilayo, L.A., Oshiobugie, M.J., & Iyobosa, A.I. (2017). Acute toxicity and hypoglycemic properties of ethanolic root extract of *Vernonia amygdalina* (bitter leaf) in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Current Research, 9* (05), 50132-50138.

Onasanwo, S.A., Oyebanjo, O.T., Ajayi, A.M., Olubori, M.A. (2017). Mechanisms of action of the anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of leaf extract of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Interculture Ethnopharmacology, 6* (2), 192-198.

Ong, K.W., Hsu, A., Song, L., Huang, D., & Tan, B.K.H. (2011). Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology, 133* (2), 598-607.

Osinubi, A.A. (2007). Effects of *Vernonia amygdalina* and chlorpropamide on blood glucose. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences, 16* (3), 115-119.

Owoeye, O., Yousuf, S., Akhtar, M.N., Qamar, K., Dar, A., Farombi, E.O., ... & Choudhary, M.I. (2010). Another anticancer elemanolide from *Vernonia amygdalina* Del. *International Journal of Biological and Chemical Sciences, 4* (1).

Owolabi, M.A., Jaja, S.I., Oyekanmi, O.O., & Olatunji, O.J. (2008). Evaluation of the antioxidant activity and lipid peroxidation of the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine, 5* (1).

Ponnamma, S.U., Manjunath, K. (2012). GC-MS analysis of phytocomponents in the methanolic extract of Justicia wyaadensis (NEES) T. Anders. *International Journal of Pharmacological and Biological Sciences, 3*, 570-576.

Ruvanthika, P.N., Manikandan, S. & Lalitha, S. (2016). A Comparative study on phytochemical screening of aerial parts of Nelumbo nucifera Gaertn by Gas Chromatographic Mass Spectrometry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 8* (5), 2258-2266.

Ryu, K.R., Choi, J.Y., Chung, S., Kim, D.H. (2011). Anti-scratching behavioral effect of the essential oil and phytol isolated from Artemisia princeps Pamp. *in mice. Planta Medica, 77*, 22-26.

Saliu, J.A., Ademiluyi, A.O., Akinyemi, A.J., & Oboh, G. (2012). In vitro antidiabetes and antihypertension properties of phenolic extracts from bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.). *Journal of Food Biochemistry, 36* (5), 569-576.

Santos C.C.M.P., Salvadori, M.S, Mota, V.G., Costa, L.M., Almeida, A.A.C.O., *et al.*, (2013). Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. *Journal of Neuroscience Article ID 949452*. doi: https://doi.org/10.1155/ 2013/949452.

Silva, R.O., Sousa, F.B., Damasceno S.R., Carvalho, N.S., Silva, V.G., Oliveira, F.R., Sousa, D.P., Aragão, K.S., Barbosa, A..L, Freitas, R.M., Medeiros, J.V. (2014). Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental and Clinical Pharmacology, 28* (4), 455-464.

Tewtrakul, S. & Itharat, A. (2007). Nitric oxide inhibitory substances from the rhizomes of Dioscorea membranacea. *Journal of Ethnopharmacology, 109*, 412-416.

Threrapanithan, C., Jaiaree, N., Itharat, A., Makchuchit, S., Thongdeeying, P., Panthong, S. (2015). Anti-inflammatory and antioxidant activities of the Thai traditional remedy called “Leard-ngam” and its plant ingredients. *Thammasat Medical Journal, 15* (3).

Tona, L., Cimanga, R.K., Mesia, K., Musuamba, C.T., De Bruyne, T., Apers, S., ... & Vlietinck, A.J. (2004). In vitro anti-plasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology, 93* (1), 27-32.

Tonukari, N.J., Avwioroko, O.J., Ezedom, T., & Anigboro, A.A. (2015). Effect of preservation on two different varieties of *Vernonia amygdalina* Del. (bitter) leaves. *Journal of Food and Nutrition Sciences, 6* (07), 623.

Udensi, E.A., Ijeh, I.I., & Ogbonna, U. (2002). Effect of traditional processing on the phytochemical and nutrient composition of some local Nigerian leafy vegetables. *Journal of Science and Technology, 8*, 37-40.

Usunomena, U. & Ngozi, O.P. (2016). Phytochemical analysis and proximate composition of *Vernonia amygdalina*. *International Journal of Scientific World, 4* (1),11-14.

Vasudevan, A., Vijayan, D., Mandal, P., Karthe, P., Sadasivan, C. & Haridas, M. (2012). Anti-Inflammatory property of n-Hexadecanoic acid: Structural evidence and kinetic assessment. *Chemical Biology & Drug Design, 80*, 434-439.

Villano, D., Ferna´ndez-Pacho´n, M., Moya,´ M., Troncoso, A., Garcı´a-Parrilla, M. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta, 71* (1), 230-235.

Wang, W.T., Liao, S.F., Wu, Z.L., Chang, C.W., & Wu, J.Y. (2020). Simultaneous study of antioxidant activity, DNA protection and anti-inflammatory effect of *Vernonia amygdalina* leaves extracts. *Plos One, 15* (7), e0235717.

Yazid, F., Hasanah, N.B., Hanafi, M., & Prasasty, V.D. (2020). Antidiabetic and antioxidant potential of *Vernonia amygdalina* leaf extract in alloxan-induced Sprague-dawley rats. *OnLine Journal of Biological Sciences, 20* (4), 190-200.

Yeap, S.K., Ho, W.Y., Beh, B.K., San Liang, W., Ky, H., Yousr, A.H.N., & Alitheen, N.B. (2010). *Vernonia amygdalina*, an ethnoveterinary and ethnomedical used green vegetable with multiple bio-activities. *Journal of Medicinal Plants Research, 4* (25), 2787-2812.

Yeap, S.K., Liang, W.S., Beh, B.K., Ho, W.Y., Yousr, A.N., & Alitheen, N.B. (2013). In vivo antidiabetic and acute toxicity of spray-dried *Vernonia amygdalina* water extract. *International Journal of Food Research, 20* (2), 613.

Zakaria, Y., Azlan, N.Z., Hasan, N.N., & Muhammad, H. (2018). In vivo antidiabetic efficacy of Malaysian *Vernonia amygdalina* aqueous extract. *Journal of Medicinal Plants Studies, 6*, 72-74.

Zakariya, A.M., Abubakar, M., Adamu, M., Zumoni, A.M., Nuhu, A., & Sabo, I. (2020). Inhibitory potential of an African *Vernonia amygdalina* (Asteraceae) leaves on a glucosidase enzyme. *Journal of Applied Biological Sciences, 14* (2), 233-239.