องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile)

CHEMICAL COMPONENTS, ANTI-OXIDANT ACTIVITY, α-GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY, AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF LEAF EXTRACT FROM *Vernonia amygdalina* Delile

วรินทร อินทน้ำเงิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile)

วรินทร อินทน้ำเงิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์ องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile)

Chemical Components, Anti-oxidant Activity, α-Glucosidase Inhibitory Activity, and Anti-inflammatory Activity of Leaf Extract from *Vernonia amygdalina* Delile

ชื่อ - นามสกุล นางสาววรินทร อินทน้ำเงิน

สาขาวิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพรัตน์ พุทธกาล, วท.ด.

ปีการศึกษา 2564

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ชูศรี ตลับมุข, Ph.D.)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ พร้อมพรม, วท.ด.)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จันทิมา ทีฆะ, Ph.D.)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพรัตน์ พุทธกาล, วท.ด.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ปร.ด.)

วันที่ 17 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2564

หัวข้อวิทยานิพนธ์ องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile)

ชื่อ - นามสกุล นางสาววรินทร อินทน้ำเงิน
สาขาวิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพรัตน์ พุทธกาล, วท.ด.
ปีการศึกษา 2564

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย พบว่า การวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่า ในสารสกัดมีสารหลักที่เป็นองค์ประกอบ 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

ซึ่งสารเคมีนี้ส่วนหนึ่งน่าจะมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัด สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูล 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ได้ และการกำจัดอนุมูล DPPH แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ คือ 1.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ 35.53$\pm$0.03% ขณะที่ที่ความเข้มข้นเดียวกัน สาร Butylated hydroxytoluene (BHT) กำจัดอนุมูล DPPH ได้มากกว่า คือ 70.37$\pm$0.00% สารสกัดยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.275 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แม้จะยับยั้งได้น้อยกว่ายา Acarbose (ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.157 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ 17.39$\pm$2.41% ขณะที่ยาต้านการอักเสบ Diclofenac ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่า คือ ร้อยละ 27.07$\pm$1.81

ผลจากการวิจัย แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเบาหวาน และต้านการอักเสบ จากการมีฤทธิ์ดังกล่าว จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ยไปพัฒนา และประยุกต์ใช้รักษาโรคที่สัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ โรคเบาหวาน และการอักเสบได้ อย่างไรก็ตาม สารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า IC_{50} ที่ 110.02$\pm$0.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การใช้สารสกัดในระดับความเข้มข้นสูง จึงควรพิจารณาใช้ความเข้มข้นต่ำๆ

คำสำคัญ: สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย เอนไซม์แอลฟา-กูลโคซิเดส ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ

Thesis Title	Chemical Components, Anti-oxidant Activity, α-Glucosidase Inhibitory Activity, and Anti-inflammatory Activity of *Vernonia amygdalina* Delile Leaf Extract
Name-Surname	Miss Varintorn Intanamgern
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Assistant Professor Nopparat Buddhakala, Ph.D.
Academic Year	2021

ABSTRACT

The investigation on chemical components, anti-oxidant activity, α-glucosidase inhibitory activity, and anti-inflammatory activity of ethanol leaf extract from *Vernonia amygdalina* Delile (LEVA) revealed that ten major chemical compounds obtained from LEVA extract were 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.

Apparently, some of these chemical compounds well responded to the activities of LEVA. The DPPH assay demonstrated that the effectiveness of LEVA in DPPH radical scavenging activity varied according to the degrees of extract concentration. At the highest concentration of 1.6 mg/ml, the LEVA exhibited 35.53±0.03% DPPH scavenging whilst Butylated hydroxytoluene (BTH) showed more potent scavenging by 70.37±0.0%. LEVA also exhibited inhibitory effect on α-glucosidase activity in vitro with an IC_{50} of 0.275 mg/ml, but its performance was less than that of Acarbose (IC_{50} of 0.157 mg/ml). Moreover, at the concentration of 50 µg/ml, LEVA exerted 17.39±2.41% inhibition on nitric oxide (NO) production, yet Diclofenac yielded better results (27.07±1.81%).

The research findings indicated the anti-oxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities of LEVA. With its chemical properties, the ethanol leaf extract from LEVA, therefore, could be further developed and utilized for treating several diseases related to free radicals, diabetes, and inflammation. However, LEVA exhibited cytotoxicity to LPS-stimulated RAW 246.7 cells with an IC_{50} of 110.02±0.86 µg/ml. Using high concentrations of LEVA must be considered.

Keywords: *Vernonia amygdalina*, α-glucosidase, anti-oxidant, anti-inflammation

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพรัตน์ พุทธกาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ข้อเสนอแนะในการดำเนินการวิจัย การวางแผนการวิจัย การเก็บรวบรวมข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล การอภิปรายผลการวิจัย ตลอดจนการเขียนรายงานการวิจัย อีกทั้งยังช่วยปรับปรุง และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการทำวิจัย และการเขียนผลการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ชูศรี ตลับมุข ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วิลาวัณย์ พร้อมพรม และผศ.ดร. จันทิมา ฑีฆะ กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร. ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) คุณเทพพิทักษ์ จิวกร่าง และคุณณัฐพล ชาวสวน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติในการทำวิจัย และแนะนำเทคนิควิธีการปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ทางชีววภาพ

กราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่เป็นอย่างสูงยิ่ง ที่อุปการะ ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา

วรินทร อินทน้ำเงิน

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ 12

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 12

1.2 วัตถุประสงค์ 13

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 13

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 14

บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15

2.1 หนานเฉาเหว่ย 15

2.2 อนุมูลอิสระ 17

2.3 เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 17

2.4 การอักเสบ 18

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 20

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 20

3.2 สารเคมี 21

3.3 การเตรียมสารสกัด 21

3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี 22

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 22

3.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 23

3.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ 24

3.8 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 26

บทที่ 4 ผล และการอภิปรายผลการวิจัย 27

4.1 องค์ประกอบทางเคมี 27

4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 29

4.3 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 31

4.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ 33

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 35

5.1 สรุปผลการทดลอง 35

5.2 ข้อเสนอแนะ 35

บรรณานุกรม 36

ภาคผนวก 46

ภาคผนวก ก การเตรียมสารสกัดจากพืชเพื่อใช้ในการวิจัย 47

ภาคผนวก ข การเตรียมสารทดสอบ และบัฟเฟอร์ 51

ประวัติผู้วิจัย 54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS 28

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 31

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย และยา Acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 32

ตารางที่ 4.4 การรอดชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย 33

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย และยา Diclofenac ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (%) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (LPS-stimulated RAW 246.7 cells) 34

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหนานเฉาเหว่ย 16

ภาพที่ 4.1 โครมาโตแกรมของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย
จากการวิเคราะห์ ด้วย GC-MS 29

ภาพที่ 1ก การเตรียมใบหนานเฉาเหว่ย 48

ภาพที่ 2ก การเตรียมสกัดสารใบหนานเฉาเหว่ย 49

ภาพที่ 3ก การระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ 50

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine transaminase หรือ Alanine aminotransferase
AST	Aspartate transaminase หรือ Aspartate aminotransferase
BHT	Butylated hydroxytoluene
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
IC50	Half maximal inhibitory concentration
LEVA	Leaf extract from Vernonia amygdalina Delile
LPS	Lipopolysaccharide
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NED	N-1-Napthylethylenediamine dihydrochloride
NO	Nitric oxide
PBS	Phosphate buffer solution
PNP-G	p-Nitrophenyl- α-D-glucopyranoside
RT	Retention Time

mg/kg	Milligram/kilogram
µg/kg	Microgram/kilogram
µl	Microlitre
มคก	ไมโครกรัม
มก	มิลลิกรัม
มล	มิลลิลิตร
กก	กิโลกรัม

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การใช้ยาแผนปัจจุบันเพื่อรักษาโรค มักเกิดปัญหาจากผลข้างเคียงของยาที่ใช้ และมีค่าใช้จ่ายสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่ต้องใช้ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานาน เช่น ยารักษาโรคเบาหวาน พืชสมุนไพรหลายชนิด สามารถนำมาใช้รักษาโรคได้ดี เกิดผลข้างเคียงน้อย อีกทั้งมีราคาถูกเมื่อเทียบกับยาแผนปัจจุบัน มีรายงานว่า พืชสมุนไพรหลายชนิด รวมทั้งหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina*) [1,2] สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ การนำพืชสมุนไพรที่สามารถใช้ทดแทน หรือใช้ควบคู่กับยาแผนปัจจุบัน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาเบาหวาน

หนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile) เป็นพืชที่ปลูกกันทั่วไปในเขตร้อนทั่วโลก ใบมีรสขม ใช้บริโภคเป็นผัก ประกอบในการปรุงอาหาร และแปรรูปเป็นชาชงสำหรับดื่ม เพื่อใช้คุมกำเนิด ลดระดับน้ำตาลในเลือด และใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน หนานเฉาเหว่ย มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ต้านมะเร็ง ต้านพยาธิ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเบาหวาน และต้านการอักเสบ หนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile) เป็นพืชที่นิยมปลูกกันทั่วไปในเขตร้อนทั่วโลก ใบมีรสขม ใช้บริโภคเป็นผัก ประกอบในการปรุงอาหาร เช่น ซุป [3] แปรรูปเป็นชาชงสำหรับดื่ม เพื่อใช้คุมกำเนิด ลดระดับน้ำตาลในเลือด [4] ชาวบ้าน และหมอยาพื้นบ้านใช้ หนานเฉาเหว่ยลดน้ำตาลในเลือดได้ [5] จึงใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน[6,7] หนานเฉาเหว่ย มีสรรพคุณ ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ต้านมาลาเรีย ต้านการอักเสบ ปกป้องตับ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านพยาธิ ลดไข้ ลดไขมันในเลือด [8] ใบ อุดมไปด้วย Flavonoids [9, 10, 11] สารสกัดจากใบมี Flavonoids, Alkaloids, Steroids, Terpenoids, Glycosides, Tannins, Phenols, Saponins และ Polysaccharides [2, 12] ใบ [13,14] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดเอทานอลจากใบ ต้านเบาหวาน [15,16,17] ลดน้ำตาลในเลือด [18] ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase และ α-glucosidase [12] หนานเฉาเหว่ย แม้ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ แต่ลดจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู [19] พิษเฉียบพลันน้อยมาก [20] ค่อนข้างเป็นพิษต่อหนูถีบจักร [21] ก่อให้เกิดการแตกของโครโมโซม [22] และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ผิวหนัง [23] แต่ก็มีรายงานว่า มีความเป็นพิษเฉียบพลันน้อย หรือไม่แสดงความเป็นพิษในหนูทดลอง [24, 25] มีความเป็น

พิษน้อยต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม [2] ไม่ก่อให้เกิดผลที่ไม่พึงประสงค์ต่อการทำงานของตับในหนู [26] ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลัน และไม่พบการตาย [27] สารสกัดเอทานอลจากใบ ต้านการอักเสบ [28, 29] Vernonioside, V จากใบสามารถยับยั้ง cytokine ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ [30]

ปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์จากหนานเฉาเหว่ย ที่ใช้เป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ เป็นที่สนใจ และมีการจำหน่ายมากขึ้น แม้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของหนานเฉาเหว่ย แต่ก็ยังไม่มีการนำพืชชนิดนี้ไปพัฒนาและผลิตเป็นยารักษาโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเบาหวาน เนื่องจาก ยังมีข้อมูลน้อย ขาดความชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ ชนิดของสารออกฤทธิ์ ผลการวิจัยที่เผยแพร่เป็นการวิจัยในสัตว์ทดลอง ตลอดจนยังมีข้อขัดแย้งเกี่ยวกับความเป็นพิษ งานวิจัยครั้งนี้ จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และฤทธิ์ต้านการอักเสบ รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย เพื่อให้ทราบชนิดของสารที่มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสารสกัด กลไกในการออกฤทธิ์ และเกิดความมั่นใจในความปลอดภัยต่อการนำไปใช้ ซึ่งจะเป็นแนวทางไปสู่การพัฒนา และประยุกต์ใช้หนานเฉาเหว่ยในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กูลโคซเดส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ หนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile) ส่วนของพืชที่ใช้ คือ ส่วนใบ

1.3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS

1.3.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

1.3.4 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กูลโคซิเดส

1.3.5 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

1.3.6 ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีวัดปริมาณไนตริกออกไซด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยไปใช้ประโยชน์กับผู้ป่วยเบาหวานซึ่งเป็นโรคที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ และการอักเสบ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัยยิ่งขึ้น

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำวิจัยในครั้งนี้ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 หนานเฉาเหว่ย

2.2 อนุมูลอิสระ

2.3 เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

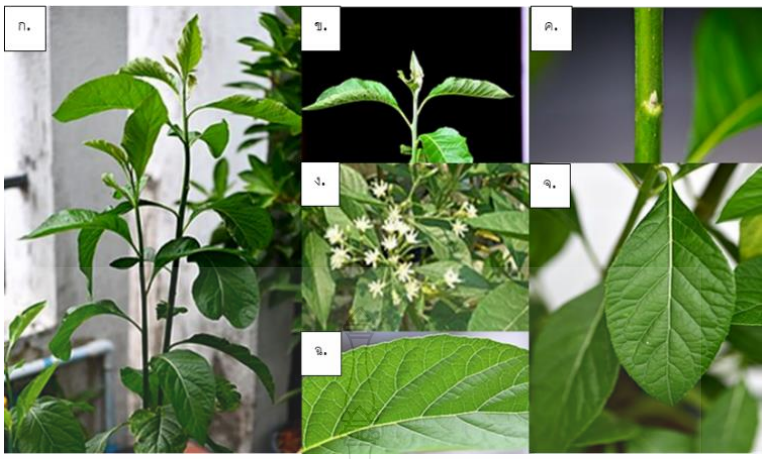
2.4 การอักเสบ

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หนานเฉาเหว่ย

หนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile) มีชื่อสามัญ คือ Bitter leaf เป็นพืชในสกุล *Vernonia* วงศ์ Compositae [4] เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 3-7 เมตร ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนาน กว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 9-22 เซนติเมตร ดอกเป็นช่อสั้น ๆ ขนาดเล็ก สีเขียวอ่อนหรือเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอม รวมกันเป็นกระจุก ผลมีลักษณะเกือบกลม ผิวเกลี้ยง ขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียว ผลแก่สีเหลืองแสด เมล็ดขนาดค่อนข้างใหญ่ หนึ่งผลมี 3 เมล็ด [31]

หนานเฉาเหว่ย เป็นพืชที่พบในเขตร้อนทั่วโลก ใบมีรสขม ใช้บริโภคเป็นผัก ประกอบในการปรุงอาหาร เช่น ซุป [3] แปรรูปเป็นชาชงดื่ม เพื่อใช้คุมกำเนิด ลดระดับน้ำตาลในเลือด [4] ชาวบ้าน และหมอยาพื้นบ้านเชื่อว่า หนานเฉาเหว่ยลดน้ำตาลในเลือดได้ [5] จึงใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน [6, 7] บรรเทาอาการท้องผูก ต้านพยาธิ [9] บรรเทาอาการไข้ มาลาเรีย คลื่นไส้ รักษาอาการผิดปกติของกระเพาะอาหาร แผลตามผิวหนัง ต่อมทอลซิลอักเสบ [32] ป้องกันและรักษาโรคความดันโลหิตสูง [33] ทุเลาปัญหาการขาดสารอาหาร [13] รักษาโรคตับ [8] และใช้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาพยาธิ การติดเชื้อจากโปรโตซัวและแบคทีเรีย [34]



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหนานเฉาเหว่ย ก. ต้น ข. ยอด ค. ตา ง. ดอก จ. ใบ แสดงลักษณะเส้นใบ และ ฉ.ใบ แสดงรูปร่างของใบ ใบเดี่ยว รูปรี ปลายแหลม [4]

หนานเฉาเหว่ย มีองค์ประกอบ เช่น โปรตีน น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แร่ธาตุพวกไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม โปแตสเซียม โซเดียม ซัลเฟอร์ ไอโอดีน วิตามินบี วิตามินซี [35] ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) สเตียรอยด์ (Steroids) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) ไกลโคไซด์ (Glycosides) แทนนิน (Tannins) ฟีนอล (Phenols) ซาโปนิน (Saponins) และโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) [2,9,10,11,12]

หนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ต้านมาลาเรีย ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านพยาธิ [8] ต้านจุลชีพ [36, 37] และปกป้องไต [38] ใบ [13] ชาจากใบ [39] และสารสกัดอะซีโตน [40] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดเอทานอลจากใบ และน้ำต้มจากใบ ลดน้ำตาลในเลือด ต้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง [15, 16, 17, 18, 41] ฟื้นฟูตับอ่อน [42] ฟื้นฟูความทนต่อกลูโคส [18] เพิ่มอินซูลิน และลดความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำเลือดได้ [43] ต้านภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ลดน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูเบาหวาน และลดน้ำตาลในเลือดของกระต่ายได้ [4, 5, 7, 14, 24, 44, 45, 46, 47] นอกจากนี้ สารสกัดเมทานอล สกัดน้ำ สารสกัดบิวทานอล สารสกัดน้ำจากใบร่วมกับยาเมทฟอร์มิน และ Fractions จากหนานเฉาเหว่ย [7, 48, 49, 50, 51, 52] สารสเตียรอยด์ (Steroid) ซาโปนิน (Saponin) เวอร์โนอะไมโอไซด์อี (Vernoamyoside E) [53] สารสกัดฟีนอล [33] Fractions [54] สารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดบิวทานอล [12] และชาชง [39] ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase และ α-glucosidase

นอกจากนี้ สารสกัดน้ำ [55] สารสกัดอะซีโตน [40] สารสกัดเมทานอล [14, 56] สารสกัดเอทานอล [28, 29] และสารเวอร์โนนิโอไซด์ (Vernonioside V) [30] มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

มีรายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษของหนานเฉาเหว่ยในระดับที่แตกต่างกัน เช่น ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ มีพิษเฉียบพลันน้อยมาก หรือไม่แสดงความเป็นพิษในหนูทดลอง

2.2 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ เป็นโมเลกุลที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย อนุมูลอิสระสร้างมาจากหลายๆ ปฏิกิริยาในร่างกาย ได้แก่ กระบวนการออกซิเดชันของกลูโคส (Glucose oxidation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนที่เกาะกับน้ำตาล (Oxidative degradation of glycated protein) และการรวมตัวกันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีน (Non-enzymatic glycation of protein) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวระหว่างเกิดการอักเสบ [49] นอกจากนี้ ยังผลิตได้จากกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ ภาวะเครียด (Stress) มลภาวะ (Pollution) ต่างๆ ทั้งทางอากาศและทางน้ำ ยาบางชนิด แอลกอฮอล์ สารเติมแต่งอาหาร กาแฟ และอาหารปิ้งย่าง

หากมีการสะสมอนุมูลอิสระสูง จะกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ หรือเซลล์ถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนมากจนเกิดมะเร็งได้ มีการกล่าวว่า โรคเบาหวานทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ และสมรรถนะของเอนไซม์ในระบบการต้านอนุมูลอิสระ และภาวะเครียดออกซิเดชัน แต่ก็ยังไม่มีข้อมูลการวิจัยที่สามารถสรุปได้แน่ชัด เนื่องจาก ปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของโรคเบาหวาน ระยะเวลาการพัฒนาของโรค เพศ อายุ และการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่อภาวะของโรค ล้วนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนและเอนไซม์ต่างๆ ได้ทั้งสิ้น [57]

2.3 เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase) ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว [25] หากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ ก็จะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง [49] กลไกนี้ได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นยารักษาเบาหวาน เช่น ยา Thiazolidinedione และยา Acarbose ซึ่งจะช่วยให้ระดับน้ำตาลกลูโคสภายหลังการรับประทานอาหารลดลง [33] แต่มักก่อให้เกิดอาการข้างเคียง เช่น ท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว ปวดท้อง และเป็นอันตรายต่อตับ [9, 37, 58] การนำสมุนไพรที่ยับยั้งกลไกนี้ได้มาใช้ควบคู่กับยาแผนปัจจุบัน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการบรรเทาโรคเบาหวาน

2.4 การอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ อาการที่ปรากฏ คือ ปวด บวม แดง และร้อน [13] เป็นกลไกสำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เชื้อโรค และเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหรือตายจากสิ่งแปลกปลอมออกไป หากมีการอักเสบเรื้อรังจะส่งผลให้การทำงานของเนื้อเยื่อผิดปกติ กระบวนการอักเสบนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่เซลล์เม็ดเลือดขาว [11, 29] ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide: NO) เป็นสารหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นในกระบวนการอักเสบ มีบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาสมดุล และป้องกันสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย [52] สังเคราะห์ได้จาก L-arginine โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) [4, 15] หากปริมาณของ NO มากเกินไปอาจทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด ความดันเลือดต่ำลง [27]

เมื่อเกิดการอักเสบ ผู้ป่วยมักจะรักษาโดยการใช้ยาแก้อักเสบ เช่น ยาไดโคลฟีแนค (Diclofenac) แม้ว่ายาแก้อักเสบสามารถช่วยลดหรือบรรเทาอาการอักเสบได้ แต่อาจทำให้เกิดอาการระคายเคือง และบาดแผลในระบบทางเดินอาหาร หากเกิดความผิดปกติควรหยุดใช้ [5]

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Alara *et al*. (2019) พบว่า สกัดใบหนานเฉาเหว่ยที่สกัดจากใบที่ตากให้แห้งในที่ร่ม และสกัดด้วยเอทานอล 60% ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 63.21±2.11, 69.70±3.27, 87.99±1.10 และ 92.25±2.43% ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด [59]

Ong *et al*. (2011) พบว่า สารสกัดหนานเฉาเหว่ย ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 28 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลได้ [18]

Njan *et al*. (2008) พบว่า เมื่อป้อนสารสกัดน้ำของหนานเฉาเหว่ย ขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน แก่หนูต่อเนื่องกัน 14 วัน ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง แต่มีการเพิ่มขึ้นของบิลิรูบิน [19]

Gabrie, Lee & Chin (2015) พบว่า เมื่อให้สารสกัดเมทานอลจากใบหนานเฉาเหว่ยขนาดสูงถึง 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ก่อให้เกิดผลที่ไม่พึงประสงค์ต่อการทำงานของตับในหนู [26]

Jing Wang *et al.* (2018) พบว่าสาร Vernoniamyoside A, Vernoniamyoside B, Vernonioside B2, Vernoniamyoside C, Vernoniamyoside D และ Vernoamyoside D มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ทดสอบโดยวิธี MTT assay [60]

Zakariya *et al.* (2020) พบว่า เมื่อให้สารสกัดน้ำของหนานเฉาเหว่ยในขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 14 วัน ทำให้มีการลดลงของเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง และเมื่อให้สารสกัดในขนาด 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของกรดยูริค [54]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator)

3.1.2 เครื่อง Microplate Reader (Asys UVM 340)

3.1.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.1.4 ปิเปตขนาดเล็ก (Micropipette)

3.1.5 จานหลุมสำหรับเพาะเลี้ยง (96-well plate)

3.1.6 หลอดดูดปลายแหลมขนาดเล็กสำหรับใช้กับปิเปต (Micropipette tip)

3.1.7 บีกเกอร์ (Beaker)

3.1.8 กระบอกตวง (Graduated cylinder)

3.1.9 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)

3.1.10 กรวยแก้ว (Glass funnel)

3.1.11 แผ่นฟอยล์ (Foil)

3.1.12 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.1.13 โหลแก้วขนาดปริมาตร 7 ลิตร

3.1.14 กระดาษกรอง No.1 (Whatman International Ltd.)

3.1.15 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 และ 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.1.16 วัสดุสำหรับขูดแยกเซลล์ออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง (Cell-scrapper)

3.1.17 ELISA plate

3.1.18 ปิเปต (Pipette) ขนาด 5 ml

3.1.19 Eppendorfft ขนาด 2.0 ml

3.1.20 ตู้บ่ม (CO_2 incubator)

3.1.21 ตู้สำหรับถ่ายเชื้อLaminar airflow hood)

3.1.22 เครื่องสำหรับนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด (Haemocytometer)

3.1.23 กล้องจุลทรรศน์ ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)

3.1.24 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Allegra® X-I5R, Beckman Coulter)

3.2 สารเคมี

3.2.1 Ethanol (C_2H_5OH)

3.2.2 Sodium carbonate (Na_2CO_3)

3.2.3 Di-potassium phosphate (K_2HPO_4)

3.2.4 Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)

3.2.5 Alpha-glucosidase enzyme

3.2.6 P-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside (PNPG)

3.2.7 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH

3.2.8 Butylated hydroxytoluene (BHT)

3.2.9 Acarbose

3.2.10 Steriled DPBS

3.2.11 Trypsin / ETDA (0.25%)

3.2.12 Fetal bovine serum (FBS)

3.2.13 Penicillin/Streptomycin (P/S)

3.2.14 Tryphan blue

3.2.15 MTT, 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide

3.2.16 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.17 Lipopolysaccharide (LPS)

3.2.18 Griess reagent

3.3 การเตรียมสารสกัด

นำใบหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Delile) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรของ ผศ.อารี ทองฤทธิ์ ตำบลคลองห้า อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ที่ไม่แก่ไม่อ่อนจนเกินไป มีลักษณะสมบูรณ์

ปราศจากโรคและแมลงทำลาย มาล้างด้วยน้ำประปาหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้สะอาดและขจัดสิ่งปนเปื้อน หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ทำให้แห้ง บด ร่อนผ่านตะแกรง จากนั้นนำไปสกัด โดยการหมัก (Maceration) ในอัตราส่วนชองผงใบหนานเฉาเหว่ย 400 กรัม : ต่อเอทานอล 95% ปริมาตร 1 ลิตร หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด กรองส่วนผสมโดยใช้กระดาษกรอง เบอร์1 (Whatman International Ltd.) นำไปทำการระเหยเพื่อเอาเอทานอลออก โดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ [61] ทำให้แห้งแข็งโดยวิธี Freeze dry แล้วเก็บไว้เพื่อรอการนำไปใช้ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วยเครื่อง GC-MS (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer) โดยส่งตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คอลัมน์ที่ใช้ คือ Agilent- CP9205 VF-WAXms (30 mx 0.25 ml x 0.25 ml) โดยมีอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 4.5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 250องศาเซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียม 99.99% เป็นตัวพา ฉีดสารสกัด (1% ในเทานอล) ปริมาตร 1ไมโครลิตร สำหรับส่วน Mass Spectrometer มีอุณหภูมิของแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนเท่ากับ 230 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิส่วนคัดแยกที่ 150 องศาเซลเซียส และพลังงานของอิเล็กตรอนที่วิ่งชนโมเลกุลของสารเท่ากับ 70 eV จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปแยกชนิดของสาร โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Mass Hunter Software

3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยวิธี 2,2- Diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging assay โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารทดสอบ (สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย และสาร BHT) ความเข้มข้น 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 ,0.1 ,0.05 ,0.025 และ 0.0125 มิลลิกรัมต่อ1.5 มิลลิลิตร นำสารทดสอบแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ในจานหลุม (96-well plate) แล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20

นาที หลังจากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD) ด้วยเครื่อง UVM 340 Microplate Reader (เครื่องที่สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.ธัญบุรี) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่า OD ที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\%\ \text{DPPH scavenging} = \frac{\mathrm{A_{control} - A_{sample}}}{\mathrm{A_{control}}} \times 100\%$$

$A_{control}$ คือ ค่า OD ของชุดควบคุม (เอทานอล 95%)

A_{sample} คือ ค่า OD ของชุดทดสอบ (สารสกัด/BHT)

คำนวณหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50) โดยคำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH scavenging กับความเข้มข้นของสารทดสอบ

3.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (Anti-alpha-glucosidase assay) ด้วยวิธี p-Nitrophenol colorimetric ในการทดสอบครั้งนี้ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Dong *et al*. (2012) [62] ดังนี้ คือ ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.094, 0.047 และ 0.023 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.8 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ในจานหลุม (96-well plate) ตามด้วยสารละลายเอนไซม์ ความเข้มข้น 0.06 หน่วย (Unit) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติมสารละลาย p-PNP-G (p-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranosidae) ที่ใช้เป็นซับสเตรท ความเข้มข้น 1.3 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Na_2CO_3 ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 160 ไมโครลิตร นำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง UVM 340 Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ยาอะคาโบส (Acarbose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) และคำนวณหาค่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (% α-glucosidase inhibition) จากสมการ

$$\%\ \alpha - \text{glucosidase inhibition} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100$$

$A_{control}$ คือ ค่า OD ของชุดควบคุม (PBS)

A_{sample} คือ ค่า OD ของชุดทดสอบ (สารสกัด/Acarbose)

คำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ได้ร้อยละ 50) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด โดยทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages) เพื่อความมั่นใจว่าสารสกัดไม่มีพิษต่อเซลล์ จึงได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด เลือกใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นซึ่งทำให้การอยู่รอดของเซลล์สูงกว่า 80% ไปใช้ในทำการทดสอบความสามารถยับยั้งการผลิตไนตริก ออกไซด์

3.7.1 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว (RAW 264.7) ซึ่งสั่งซื้อจาก 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 และ 1% Antibiotics penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบ่มในตู้บ่มเชื้อ (5% CO_2 incubator) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น เตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร บ่มในตู้บ่ม ที่ 5%CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer solution (PBS) 2 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสำเร็จรูป (DMEM+10%FBS+1%P/S) 2 -3 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ หลังจากนั้นใช้ Cell - scrapper ทำให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดรูปชมพู่ จนเซลล์หลุดออกจากกัน และกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ อย่างสม่ำเสมอ ทำการเจือจางเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น $1x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ โดยวิธี 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Threrapanithan *et al.* (2015) [63] และ Bahuguna *et al*. (2017) [64] โดยนำสารสกัดมาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้มีความเข้มข้น 50-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากแต่ละหลุม แล้วล้างด้วย DPBS 1 ครั้ง เติมสารละลายตัวอย่างทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10-100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร, 0.1-1% (ปริมาตร/ปริมาตร) และ 10-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามชนิดตัวอย่างทดสอบ ร่วมกับ LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงสารละลายควบคุมเชิงบวก (10% DMSO) และเชิงลบ (Blank) ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่ม (CO_2 Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง และเติมสารละลาย MTT ในสารละลาย PBS ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม และอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง จากนั้น ดูดสารละลายในแต่ละหลุมทิ้ง และเติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นาน 15 นาที เพื่อล้างตะกอน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) จากสมการ

$$\%\ \text{cell viability} = \left(\frac{\text{OD of treated sample}}{\text{OD of untreated sample}}\right) \text{x } 100$$

OD of treated sample คือ ค่า OD ของชุดทดสอบที่ได้รับสารทดสอบ

OD of untreated sample คือ ค่า OD ของชุดทดสอบที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

3.7.2 การศึกษาการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

ทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite) โดยใช้ Griess assay ด้วยชุดทดสอบ Griess Reagent kit ในการทดสอบครั้งนี้ ได้ดำเนินการตามวิธีการของ Meerloo *et al*. (2011) [65] ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้

เตรียมสารมาตรฐาน nitrite standard (0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 และ100 ไมโครโม-ลาร์ที่เจือจางด้วย PBS) จากนั้นนำสารละลาย Sulfanilamide และN-1-napthylethylenediamine

dihydrochloride (NED) ใส่ในสารมาตรฐาน และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการสัมผัสสารสกัด หลุมละ 50 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลุม เพื่อทำ 3 ซ้ำ เติมสารละลาย Sulfanilamide จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-10 นาที แล้วเติมสารละลาย NED จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม แล้วบ่มต่อ 5-10 นาที จากนั้น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ จากสมการ

$$\%\text{inhibition of NO production} = [\frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}}] \times 100$$

$OD_{control}$ คือ ค่า OD ของชุดควบคุม

OD_{sample} คือ ค่า OD ของชุดทดสอบ

คำนวณหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัด ที่ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และเปรียบเทียบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัด กับยาต้านการอักเสบ Diclofenac

3.8 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าสถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ค่าร้อยละ ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (Mean±SEM) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance ; One-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Least significant difference (LSD), Student - t test และ Duncan multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS กำหนดค่าความเชื่อมั่นทางสถิติที่ $p<0.05$

บทที่ 4

ผล และการอภิปรายผลการวิจัย

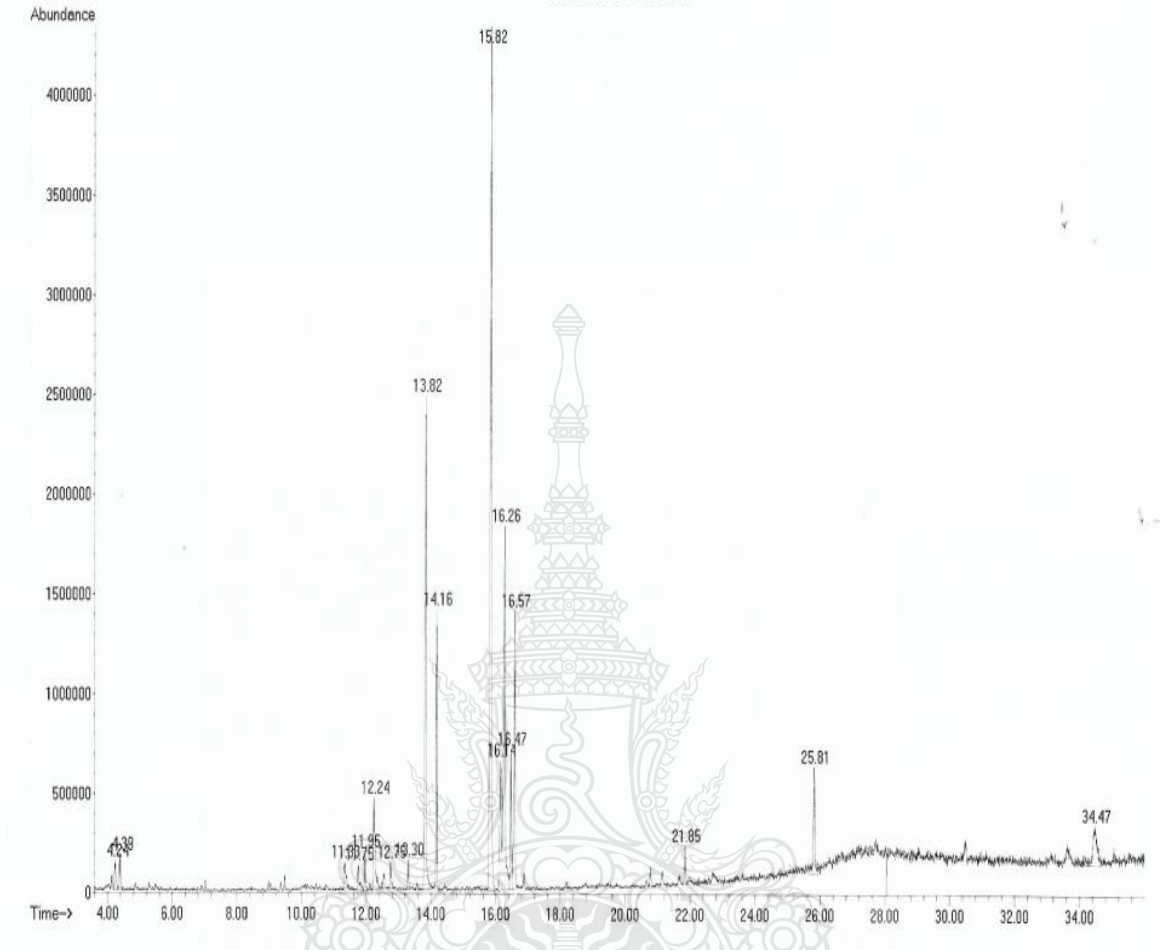
4.1 องค์ประกอบทางเคมี

จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบสารหลักจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ Benzoic acid (0.92%), Neophytadiene (3.60%), Xylocaine (0.72%), Hexadecanoic acid (14.08%), Hexadecanoic acid ethyl ether (5.67%), Phytol (30.80%), (z,z)-9,12-Octadecadienoic acid (1.71%), (z,z,z)-9,12,15-Octadecatrien-1-ol (14.50%), (z,z,z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid ethyl ester (7.14%) และ Octadecanoic acid (3.59%) โดยมีรายละเอียดของสารแต่ละชนิด ดังแสดงใน ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1

การศึกษาจากเอกสาร พบว่า n-Hexadecanoic acid เป็นกรดไขมันอิ่มตัว มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ [66, 67, 68, 69] Phytol เป็นสารประกอบเทอร์ปีนมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง [66, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76] 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)- เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดที่จำเป็น สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และกำจัดอนุมูลอิสระได้ [77] 9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ และลดน้ำตาลในเลือดได้เช่นกัน [78, 79] ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มีส่วนทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม ชนิดของสารเคมีที่พบในสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยครั้งนี้ แตกต่างจากบางงานวิจัยอันเนื่องมาจากวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารแตกต่างกัน [35]

ตารางที่ 4.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ลำดับ	เวลาที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (RT)	ชื่อสารประกอบ	สูตรเคมี	พื้นที่(%)
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



ภาพที่ 4.1 โครมาโตแกรมของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS

4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูล 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 ขณะที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ สาร BHT กำจัดอนุมูลอิสระ 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) สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} 0.151±0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สาร BHT มีค่า IC_{50}

0.105±0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสาร BHT ผลจากการวิจัยในครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบ [13] ชาชงจากใบ [39] สารสกัดอะซีโตน [40] สารสกัดน้ำ [29] สารสกัดเมทานอล [14] และสารสกัดเอทานอล [2] ของใบหนานเฉาเหว่ย และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่พบว่า สกัดใบหนานเฉาเหว่ยที่สกัดจากใบที่ตากให้แห้งในที่ร่ม และสกัดด้วยเอทานอล 60% ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 63.21±2.11, 69.70±3.27, 87.99±1.10 และ 92.25±2.43% ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด [59] เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ คือ ที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ 92.25±2.43% ซึ่งสูงกว่าสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยจากงานวิจัยในครั้งนี้ ที่ใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระเพียง 50.93±0.01% แม้จะใช้ตัวทำละลายซึ่งเป็นเอทานอลเช่นเดียวกัน แต่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และวิธีการทำให้แห้งแตกต่างกัน คือ ทำให้แห้งด้วยการตากในที่ร่ม และการทำให้แห้งโดยการอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความร้อนหรืออุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้แห้งอาจส่งผลต่อการออกฤทธิ์

ศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหนานเฉาเหว่ย ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของสารสกัด [2,29, 77] ความเข้มข้นของสารสกัด วิธีสกัด การเตรียมพืชก่อนการสกัด ล้วนมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัด นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม [59]

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

ความเข้มข้น (มก/มล)	ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH			
	% การกำจัด		IC_{50} (มก/มล)	
	LEVA	BHT	LEVA	BHT
1.6	50.93 ± 0.01^{gA}	79.68 ± 0.01^{gB}		
0.8	44.77 ± 0.02^{fA}	78.88 ± 0.01^{gB}		
0.4	35.67 ± 0.00^{eA}	69.73 ± 0.02^{fB}		
0.2	32.12 ± 0.01^{eA}	57.84 ± 0.02^{eB}	0.15 ± 0.001^{B}	0.105 ± 0.002^{A}
0.1	27.45 ± 0.00^{dA}	40.47 ± 0.01^{dB}		
0.05	$20.62\pm.0.01^{cA}$	26.73 ± 0.02^{cB}		
0.02	14.00 ± 0.01^{bA}	21.04 ± 0.01^{bB}		
0.01	8.60 ± 0.01^{aB}	5.57 ± 0.01^{aA}		

ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean ± SEM) ของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกัน ($^{a, b, c, \ldots}$) และค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรแตกต่างกัน (A, B) แสดงว่า มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p<0.05$)

4.3 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย พบว่า สารสกัด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ น้อยกว่ายา Acarbose โดยมีค่า IC_{50} 0.275 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ยา Acarbose มีค่า IC_{50} 0.157 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบในครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานผลการวิจัย ที่พบว่า ชาชง [39] สารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดบิวทานอล [12] สารสกัดฟีนอล [33] Steroid saponin และ Vernoamyoside E [14, 78] จาก

หนานเฉาเหว่ย มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase และ α-glucosidase อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาด และระยะเวลาในการสารสกัด [18] และชนิดของสารสกัด [77] ชนิดของสัตว์ทดสอบ [27] และปริมาณของสารออกฤทธิ์ [18]

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย และยา Acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

ความเข้มข้น (มก/มล)	**การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส**			
	ร้อยละในการยับยั้ง (%)		IC_{50} (มก/มล)	
	LEVA	Acarbose	LEVA	Acarbose
3.00	53.02±0.00^{eA}	80.19±0.01^{bB}		
1.50	46.99±0.01^{eA}	79.00±0.00^{bB}		
0.75	37.25±0.00^{dA}	77.70±0.00^{bB}		
0.38	31.55±0.00^{cdA}	76.87±0.00^{bB}	0.275±0.001^{B}	0.157±0.002^{A}
0.19	26.22±0.00^{cA}	75.56±0.01^{bB}		
0.09	23.61±0.00^{bcA}	74.85±0.01^{bB}		
0.05	16.96±0.01^{bA}	73.90±0.00^{abB}		
0.02	8.78±0.00^{aA}	67.85±0.00^{aB}		

ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean ± SEM) ของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกัน ($^{a, b, d, ...}$) และค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรแตกต่างกัน (A, B) แสดงว่า มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p<0.05$)

4.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) โดยวิธี MTT assay พบว่า หลังจากเซลล์ RAW 264.7 สัมผัสกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 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 จะเห็นได้ว่า สารสกัดค่อนข้างเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นที่สูง โดยมีค่า IC_{50} 110.02 ± 0.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การรอดชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	**อัตราการรอดชีวิต (%)**	**IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**
25	102.93±1.67^{d}	
50	104.25±2.89^{d}	
100	85.87±3.92^{cA}	
150	34.33±2.23^{b}	
200	5.59±0.13^{a}	110.02 ± 0.86^{B}
250	5.48±0.03^{a}	
500	ND	
750	ND	
1000	ND	

ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean ± SEM) ของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกัน ($^{a, b, c, d}$) และค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรแตกต่างกัน (A, B) แสดงว่า มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p<0.05$) ND = ไม่สามารถตรวจสอบได้

การทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ได้ 13.78±2.07, 17.39±2.41 และ 29.97±2.58% ตามลำดับ แต่ยับยั้งได้น้อยกว่ายา Diclofenac ที่ยับยั้งได้ถึง 27.07±1.81% (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย และยา Diclofenac ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (%) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (LPS-stimulated RAW 246.7 cells)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	**การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (%)**	
	สารสกัด	Diclofenac
25	13.78±2.07[a]	NA
50	17.39±2.41[aA]	27.07±1.81[bB]
100	29.97±2.58[b]	NA

ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean ± SEM) ของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกัน ([a, b]) และค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกัน (A, B) แสดงว่า มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p<0.05$) NA= ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

การวิจัยในครั้งนี้ สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผลการวิจัยในครั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบของหนานเฉาเหว่ย [28, 29,30, 40, 55, 56]

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มีสารเคมีหลักจำนวน 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 ซึ่งส่วนหนึ่งมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสารสกัด และสารสกัดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดอนุมูล DPPH แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT สารสกัดยังมีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส แต่มีฤทธิ์น้อยกว่ายา Acarbose นอกจากนี้ สารสกัดแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ แต่ยับยั้งได้น้อยกว่ายา Diclofenac อย่างไรก็ตาม สารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น จึงควรระมัดระวังเมื่อต้องใช้หนานเฉาเหว่ยในปริมาณมาก ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

สารสกัดเอทานอลใบหนานเฉาเหว่ย มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านเบาหวาน และต้านอนุมูลอิสระ จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดนี้ ไปทำการวิจัย/ทดลองต่อยอดทางคลินิก อันจะเป็นแนวทางไปสู่การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการรักษาโรคที่สัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ รวมทั้งโรคเบาหวาน และการอักเสบ

บรรณานุกรม

[1] ธนากรณ์ ดาสุด ฐิติกร จันทร์วุ่น นฤมล ศรีเมฆ และสุธรรม ส่งแสง, “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสของส่วนสกัดขนุนอ่อน,” วารสารวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ปีที่ 45(3), นน. 543-550, 2560.

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

[3] J. Hutchioson and J. M. Dalzell, “Flora of West Africa (2nd edition) agent London” pp. 450 – 455, 1963.

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

[5] Y. Zakaria, N. Z. Azlan, N. N. Hasan, and H. Muhammad, “In vivo antidiabetic efficacy of Malaysian *Vernonia amygdalina* aqueous extract,” Journal of Medicinal Plants Studies, Vol. 6, pp. 72-74, 2018.

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

[7] S. I. R. Okoduwa, I. A. Umar, D. B. James, and H. M. Inuwa, “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, Vol. 8(3), No. 74, 2017.

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

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

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

[11] E. A. Udensi, I. I. Ijeh, and U. Ogbonna, "Effect of traditional processing on the phytochemical and nutrient composition of some local Nigerian leafy vegetables," Journal of Science and Technology, Vol. 8, pp. 37-40, 2002.

[12] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, C. I. Ukaegbu, and N. A. Kabbashi, "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, Vol. 13(1), pp. 414-422, 2019.

[13] N. J. Tonukari, O. J. Avwioroko, T. Ezedom, and A. A. Anigboro, "Effect of preservation on two different varieties of *Vernonia amygdalina* Del. (bitter) leaves," Journal of Food and Nutrition Sciences, Vol. 6(07), No. 623, 2015.

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

[15] O. A. Adaramoye, O. Akintayo, J. Achem, & M. A. Fafunso, "Lipid-lowering effects of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* leaves in rats fed on high cholesterol diet," Vascular Health and Risk Management, Vol. 4(1), No. 235, 2008.

[16] P. E. Ebong, I. J. Atangwho, E. U. Eyong, C. Ukwe, and A. U. Obi, "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, November, 2006, pp. 83-89.

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

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

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

[20] I. Nabukenya, C. Rubaire-Akiiki, D. Mugizi, J. Kateregga, and D. Olila, "Sub-acute toxicity of aqueous extracts of Tephrosia vogelii, *Vernonia amygdalina* and *Senna occidentalis* in Rats," Natural Product Research, Vol. 2, pp. 70-100, 2014.

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

[22] J. O. Okwuzu, P. Odeiga, O. A. Otubanjo, and O. C. Ezechi, "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, Vol. 17(1), pp. 147-153, 2017.

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

[24] P. A. Akah, and C. L. Okafor, “Blood sugar lowering effect of *Vernonia amygdalina* Del, in an experimental rabbit model,” Phytotherapy Research, Vol. 6(3), pp. 171-173, 1992.

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

[26] G. Akowuah, M. Lee, and H. Chin, “Toxicological evaluation of *Vernonia amygdalina* methanol leave extract in rats,” Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 2015.

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

[28] O. M. Kola, “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, Vol. 1(2), pp. 127-31, 2007.

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

[30] T. X. T. Nguyen, D. L. Dang, V. Q. Ngo, T. C. Trinh, Q. N. Trinh, T. D. Do, and T. T. T. Thanh, “Anti-inflammatory activity of a new compound from *Vernonia amygdalina*,” Natural Product Research, pp. 1-6, 2020.

[31] วลัยพร สินสวัสดิ์, วรรณา ศรีเพ็ชราพร, ประนอม สุขเกื้อ, ชื่นสุมณ ยิ้มถิน, อรุณี ชัยศรี และสิริยากร คล้ายสอน, “การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ใบหนานเฉาเหว่ยและใบมะม่วงหาว มะนาวโห่,” รายงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์พระนครศรีอยุธยา, หันตรา, 2564.

[32] W. Abebe, “Traditional pharmaceutical practice in Gondar region,” Northwestern Ethiopia, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 11(1), pp. 33-47, 1984.

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

[34] E. O. Farombi and O. Owoeye, “Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and Garcinia biflavonoid,” International Journal of Environmental Research and Public Health, Vol. 8(6), pp. 2533-2555, 2011.

[35] ศรีสมพร ปรีเปรม, “การศึกษาด้านเภสัชเวทของหนานเฉาเหว่ย,” คณะเภสัชศาสตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ศูนย์การศึกษาต่อเนื่องทางเภสัช, 2561.

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

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

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

[39] O. L. Erukainure, C. I. Chukwuma, O. Sanni, M. G. Matsabisa, and M. S. Islam, “Histochemistry, phenolic content, antioxidant, and anti-diabetic activities of *Vernonia amygdalina* leaf extract,” Journal of Food Biochemistry, Vol. 43(2), pp. 12-737, 2019.

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

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

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

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

[44] A. Ayodele, A. T. Adeoye, A. D. Adedapo, T. O. Omobowale, A. A. Adedapo, and A. A. Oyagbemi, "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, Vol. 1(1), pp. 1-12, 2017.

[45] M. I. Ejioforinnocent, M. K. Zaman, and A. Das, "Antidiabetic evaluations of different parts of *Vernonia amygdalina*," IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS), Vol. 12(4), pp. 23-2, 2017.

[46] C. E. Offor, "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, Vol. 4(1), pp. 201-209, 2015.

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

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

[49] U. A. Michael, B. U. David, C. O. Theophine, F. U. Philip, A. M. Ogochukwu, and V. A. Benson, "Antidiabetic effect of combined aqueous leaf extract *of Vernonia amygdalina* and metformin in rats," Journal of Basic and Clinical Pharmacy, Vol. 1(3), No. 197, 2010.

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

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

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

[53] H. L. T. Anh, L. B. Vinh, L. T. Lien, P. V. Cuong, M. Arai, T. P. Ha, and Y. H. Kim, "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, Vol. 35(5), pp. 873-879, 2021.

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

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

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

[57] G. Refilwe Kudumela, J. Lyndy McGaw and Peter Masoko, "Antibacterial interactions, anti-inflammatory and cytotoxic effects of four medicinal plant species," Kudumela et al. BMC Complementary and Alternative Medicine Vol. 18, No. 199, 2018.

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

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

[60] J. Wang, H. Song, X. Wu, S. Zhang, X. Gao, F. Li, and Q. Chen, "Steroidal saponins from *Vernonia amygdalina* Del. and their biological activity," Molecules, Vol. 23(3), 579, 2018.

[61] S. Sakuljaitrong, N. Buddhakala, S. Chomko, and C. Talubmook, "Effects of flower extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) on hypoglycemic and hypolipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats," IJSER, Vol. 4, pp. 1441-1446, 2013.

[62] H. Q Dong, M. Li, F. Zhu, F. L Liu, and J. B. Huang, "Inhibitory potential of trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd against α-glucosidase and α-amylase linked to type 2 diabetes," Food Chemistry, Vol. 130, pp. 261-266, 2012

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

[64] A. Bahuguna, I. Khan, V.K. Bajpai, and S.C. Kang, "MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug," Bangladesh Journal of Pharmacology, Vol. 12, pp. 115-118, 2017.

[65] Van Meerloo, Johan, Gertjan JL Kaspers, and Jacqueline Cloos, “Cell sensitivity assays: the MTT assay”. In: Cancer cell culture. Humana Press, pp. 237-245, 2011.

[66] S. Chitra, and J. Karthikeyan, “Phytochemical profiling of cat whisker’s (*Orthosiphon stamineus*) tea leaves extract,” Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, Vol. 7(6), pp. 1396-1402, 2018.

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

[68] P. N. Ruvanthika, S. Manikandan, and S. Lalitha, “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, Vol. 8(5), pp. 2258-2266, 2016.

[69] A. Vasudevan, D. Vijayan, P. Mandal, P. Karthe, C. Sadasivan, and M. Haridas, “Anti-Inflammatory property of n-Hexadecanoic acid: Structural evidence and kinetic assessment,” Chemical Biology & Drug Design. Vol. 80, pp. 434-439, 2012.

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

[71] J. de Moraes, R. N. de Oliveira, J. P. Costa, A. L. Junior, D. P. de Sousa, R. M. Freitas, and P. L. Pinto, “Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni,” PLoS neglected tropical diseases, Vol. 8(1), 2014.

[72] C. Harish, Upadhyay, A. Mishra, J. Pandey, P. Sharma, A.K. Tamrakar, A.K. Srivastava, F. Khan and S.K. Srivastava, “In vitro, in vivo and in silico antihyperglycemic activity of some semi-synthetic phytol derivatives,” Medicinal Chemistry, Vol. 17, 2021.

[73] M. T. Islam, S.A. Ayatollahi, S.M.N. Kabir Zihad, N. Sifat, M.R. Khan, P. Arkajyoti, B. Salehi, T. Islam, M.S. Mubarak, N. Martins, and J. Sharifi-Rad, "Phytol anti-inflammatory activity: pre-clinical assessment and possible mechanism of action elucidation," Cell Molecular Biology, (Noisy-le-grand), Vol. 66(4), No. 25; pp. 264-269, 2020.

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

[75] C. C. D. M. P. Santos, M. S. Salvadori, V. G. Mota, L. M. Costa, A. A. C. de Almeida, G. A. L. de Oliveira, and R. N. de Almeida, "Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models," Neuroscience Journal, 2013, 2013.

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

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

[78] D. E. Barre, "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, Vol. 56(7), pp. 319-325, 2007.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารสกัดจากพืชเพื่อใช้ในการวิจัย

(ก)

(ข)

ภาพที่ 1ก การเตรียมใบหนานเฉาเหว่ย

(ก) ใบหนานเฉาเหว่ยที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ

(ข) ใบหนานเฉาเหว่ยที่ทำการอบด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ก)

(ข)

ภาพที่ 2ก การเตรียมสกัดสารใบหนานเฉาเหว่ย

(ก) ใบหนานเฉาเหว่ยที่หมักด้วยเอทนอล 95%

(ข) การกรองสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยเพื่อเอาส่วนใส ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

ภาพที่ 3ก การระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารทดสอบ และบัฟเฟอร์

1. การเตรียมสารสกัดให้อยู่ในรูปสารละลายเพื่อใช้ในการทดลอง

1.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

ชั่ง สารสกัด ปริมาตร 1.6 มิลลิกรัม/ 1.5 มิลลิลิตร เตรียมโดยทำละลายใน Absolute ethanol 95% และกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อนำไปใช้การทดสอบ

1.2 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

ชั่ง สารสกัด ปริมาตร 3 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร เตรียมโดยทำละลายใน Phosphat buffer และกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อนำไปใช้การทดสอบ

1.3 การทดสอบอัตราการรอดชีวิต

ชั่ง สารสกัด ปริมาตร 1000 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เตรียมโดยทำละลายใน อาหารเลี้ยงเซลล์ และกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อนำไปใช้การทดสอบ

1.4 การทดสอบการต้านการอักเสบ

ชั่ง สารสกัด ปริมาตร 1000 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เตรียมโดยทำละลายใน อาหารเลี้ยงเซลล์ และกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อนำไปใช้การทดสอบ

2. การเตรียม DPPH

ชั่ง DPPH ปริมาตร 0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เตรียมโดยทำละลายใน Absolute ethanol 95%

3. การเตรียม BHT

ชั่ง BHT ปริมาตร 1.6 มิลลิกรัม/ 1.5 มิลลิลิตร

เตรียมโดยทำละลายใน Absolute ethanol 95%

4. การเตรียม Phosphat buffer

ชั่ง K_2HPO_4 ปริมาตร 4.32 กรัม

ชั่ง KH_2PO_4ปริมาตร 3.42 กรัม

น้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ทำการละลายสารทีละตัว จากนั้น นำมาผสมกัน ปรับปริมาตรตามต้องการ และนำไปปรับค่าpH 6.8

5. การเตรียมยา Acarbose

ใช้ตัวยาตามท้องตลาด จำนวน 1 เม็ด ทำละลายด้วย Phosphat buffer 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

6. การเตรียมโซเดียมคาร์บอเนต

ชั่ง Na_2CO_3 ปริมาตร 2.12 กรัม

Phosphat buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7. การเตรียม PNPG

ชั่ง PNPG ปริมาตร 0.0195 กรัม

Phosphat buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

8. การเตรียมเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

ชั่ง เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ปริมาตร 0.28 มิลลิกรัม

Phosphat buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววรินทร อินทน้ำเงิน
วัน เดือน ปี เกิด	22 มกราคม 2540
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ ปทุมธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
สถานที่ที่สามารถติดต่อได้	69/6 หมู่ 5 ซอยมิตรสัมพันธ์ ตำบลลำลูกกา อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12150 เบอร์โทรศัพท์ : 09 3927 6359 E-mail address: varintorn2201@gmail.com