

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบหนานเฉาเหว่ย

ณพัฐอร บัวฉวน*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

1 หมู่ 20 ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอลำลูกหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

รับบทความ 17 มกราคม 2567 แก้ไขบทความ 26 สิงหาคม 2567 ตอบรับบทความ 25 กันยายน 2567

บทคัดย่อ

จากภูมิปัญญาท้องถิ่นพบว่าสมุนไพรหนานเฉาเหว่ยเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยา เช่น ช่วยลดน้ำตาลในเลือด และลดความดัน งานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย ผลการศึกษาเมื่อทำการสกัดใบหนานเฉาเหว่ยด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จะได้ร้อยละสารสกัดเท่ากับ 11.59 และพบว่า สารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 59.03 ± 0.67 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อกรัมสารสกัด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 22.98 ± 0.21 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัด และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH free radical scavenging พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.37 ± 1.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และ เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.39 ± 1.08 และ 11.08 ± 0.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานอะคาร์โบสที่ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และ เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.08 ± 0.21 และ 12.47 ± 0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดส อยู่ในระดับที่สูงเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ดังนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์และองค์ประกอบทางเคมีให้กว้างขวาง เพื่อนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในการรักษาโรคที่สัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ รวมทั้งโรคเบาหวาน

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, แอลฟา-อะไมเลส, แอลฟา-กลูโคซิเดส, หนานเฉาเหว่ย

Antioxidant, Anti- α -Amylase and α -Glucosidase Activities Ethanollic Extract from *Vernonia amygdalina* Leave

Napattaorn Buachoon*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage
1 Moo 20, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani, 13180

Received 17 January 2024; Revised 26 August 2024; Accepted 25 September 2024

Abstract

From local wisdom, it is found that *Vernonia amygdalina* is a medicinal plant used for medicinal purposes such as helping to reduce blood sugar and pressure but only few academic supports are still provided. The objective of this study is to determine the total phenolic content, total flavonoids content, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities extract from *V. amygdalina* leaves. In this study, the leave extract of *V. amygdalina* showed the total phenolic content at 59.03 ± 0.67 mg GAE/g extract, and total flavonoid content at 22.98 ± 0.21 mg QE/g extract. The antioxidant activity of *V. amygdalina* leave extract determined using DPPH free radical scavenging method was found with IC_{50} value of 9.37 ± 1.31 mg/mL. Additionally, the extract from dried leaves of *V. amygdalina* extracted showed good anti- α -glucosidase and anti- α -amylase activities with IC_{50} values of 10.39 ± 1.08 and 11.08 ± 0.76 mg/mL, respectively, compared with those of acarbose with IC_{50} values of 14.08 ± 0.21 and 12.47 ± 0.46 mg/mL respectively. Therefore, extensive studies of biological activity and composition should be conducted to lead the development of products for use in the therapy of free radical related diseases and diabetes.

Keywords : Antioxidant activity, α -amylase inhibitor, α -glucosidase inhibitor, *Vernonia amygdalina*

* Corresponding Author. Tel.: +668 1413 5944, E-mail Address: napattaorn@vru.ac.th

1. บทนำ

สมุนไพรหนานเฉาเหว่ย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Vernonia amygdalina* เป็นพืชวงศ์ทานตะวัน (Compositae) มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น สูง 6-8 เมตร เเพาะปลูกง่าย จากภูมิปัญญาด้านสมุนไพรมีการนำใบหนานเฉาเหว่ยมารับประทานเป็นยารักษาโรคเบาหวาน ในรูปแบบการแปรรูปเป็นชาชงดื่ม เพื่อช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ชาวบ้านและหมอพื้นบ้านเชื่อว่าหนานเฉาเหว่ยลดน้ำตาลในเลือดได้ [1], [2] นอกจากนี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อสนับสนุนการนำมาใช้ประโยชน์ทางยา ได้แก่ สารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 250 มลต่อปริมาตร มีผลการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging ได้ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำเย็นและน้ำร้อน ตามลำดับ นอกจากนี้มีรายงานฤทธิ์ว่าสารสกัดหนานเฉาเหว่ยด้วยเมทานอลยังสามารถลดน้ำตาลในเลือดหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย Alloxan ด้วยการทดสอบให้สารสกัดจากหนานเฉาเหว่ยทางปากเป็นเวลา 28 วัน พบว่า สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ถึง 32.1% ทั้งนี้เนื่องจากในใบหนานเฉาเหว่ยมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ และสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดผ่านกลไกการเพิ่มอินซูลินและการสังเคราะห์ไกลโคเจนในกล้ามเนื้อสัตว์ทดลอง [3] และมีรายงานว่าสารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ยด้วยเอทานอล น้ำ และบิวทานอลสามารถต้านภาวะน้ำตาลในเลือดสูง [4] เมื่อนำสารสกัดด้วยน้ำจากใบหนานเฉาเหว่ยมาใช้ร่วมกับยารักษาเบาหวานเมทฟอร์มิน สามารถลดน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูที่เป็นโรคเบาหวานได้ [5] นอกจากนี้ยังพบรายงานที่ สารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ยมีสารสำคัญ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) ไกลโคไซด์ (glycosides) แทนนิน (tannins) ฟีนอล

(phenols) ซาโปนิน (saponins) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) [6]

อนุมูลอิสระ (free radicle) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งโดยปกติในร่างกายมีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ส่งผลทำให้เซลล์ร่างกายเสียหาย โดยที่ร่างกายสามารถสร้างอนุมูลอิสระขึ้นได้ด้วยอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion, hydroxyl radicle, peroxy radicle, hydrogen peroxide และ lipid peroxyl [7] เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ของร่างกาย ผลทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ซึ่งโรคมะเร็ง หัวใจและหลอดเลือด แก่ก่อนวัย และโรคอื่นๆ เช่น อนุมูลอิสระไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลายจะทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องมีสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระซึ่งกลไกในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับกับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติ เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบไนโตรเจน และแคโรทีนอยด์ [7]

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งมีสาเหตุมาจากเซลล์สร้างอินซูลินในตับอ่อน เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดถูกทำลาย ทำให้ร่างกายหยุดการหลั่งอินซูลิน หรือการหลั่งอินซูลินน้อยลง เกิดจากอินซูลินที่

หลังจากออกมาไม่สามารถทำงานได้ตามปกติเนื่องจากมีภาวะดื้ออินซูลิน ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติ ผลกระทบของโรคเบาหวานต่อร่างกายในระยะยาว ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ โรคเบาหวานสามารถจำแนกเป็น 2 ชนิด โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 Diabetes, Insulin-dependent diabetes mellitus หรือ IDDM) สาเหตุเกิดจาก CD4 (helper T cells) และ CD8 (killer cell) ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมีการทำลายเบตาเซลล์(β -cell) โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 Diabetes, Noninsulin-dependent diabetes mellitus หรือ NIDDM) เป็นชนิดที่พบบ่อย ผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานชนิดนี้ ร่างกายยังคงมีการสร้างและหลั่งอินซูลิน แต่อินซูลินที่หลั่งออกมาไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ หรือเกิดภาวะดื้ออินซูลิน โรคเบาหวานชนิดนี้สามารถรักษาโดยการควบคุมอาหารหรือรับประทานยา ร่วมกับ ในรายที่ป่วยเป็นระยะเวลานานจำเป็นต้องได้รับการฉีดอินซูลินทดแทนเพิ่มเติมด้วย งานวิจัยทางคลินิกที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กันระหว่างการพัฒนาของโรคเบาหวานและระดับของภาวะเครียดออกซิเดชันในร่างกายของผู้ป่วย โดยพบว่า เมื่อระดับน้ำตาลสูงขึ้นสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระมากมาย และส่งผลทำให้ลดการทำงานของระบบต้านทานอนุมูลอิสระในร่างกาย โดยกลไกที่เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ กระบวนการออกซิเดชันของกลูโคส กระบวนการรวมตัวกันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีน และการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่เอมีโนในโครงสร้างของโปรตีนที่เกาะกับน้ำตาล [8]

ในปัจจุบันพบว่ามีนักวิจัยได้ให้ความสนใจที่จะศึกษาสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาโรคเบาหวานกันมากขึ้น โดยเฉพาะการศึกษาสารจากสมุนไพรเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลต่อการเกิดโรคเบาหวาน ได้แก่ แอลฟา-กลูโคซิเดส (α -glucosidase) และแอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่ใน

การย่อยแป้ง หากสารสกัดหยาบสมุนไพรสามารถที่จะช่วยในการชะลอการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นโมเลกุลเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ การรักษาด้วยสารยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส และ แอลฟา-อะไมเลสจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง นอกจากนี้สารยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส และแอลฟา-อะไมเลส ยังช่วยลดระดับอินซูลิน สามารถต้านโรคมะเร็ง ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น อะคาร์โบส (acarbose) วอกลีโบส (voglibose) และมิกลิทอล (miglitol) โดยจะมีผลในการลดระดับน้ำตาลหลังรับประทานอาหาร

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส และ แอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจะนำใบหนานเฉาเหว่ยมาเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานและยังเป็นข้อมูลพื้นฐานของพืชสมุนไพรในชุมชน

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 ขั้นตอนการวิจัย

2.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบหนานเฉาเหว่ย

ใบหนานเฉาเหว่ยที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ได้เก็บรวบรวมจากแหล่งเพาะปลูกในตำบลตาพระยา อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว โดยเลือกเฉพาะใบอ่อนทำการพิสูจน์เอกลักษณ์พืช โดยส่งตัวอย่างใบหนานเฉาเหว่ยไปที่กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร นำมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบมา 2,950 กรัม บดให้ละเอียด ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:2 [9] ด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ปิดภาชนะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด กรองด้วย

2.1.2 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

$$Y = 0.0441x + 0.291$$

2.1.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

0.05 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 99.9 % เอทานอล เป็นตัวทำละลาย) นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบและ สารมาตรฐาน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป ในน้ำกลั่น ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5% มวลต่อ ปริมาตร โซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 % มวลต่อปริมาตร อะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที เติมน้ำกลั่นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10.0 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ดัดแปลง จากวิธีการของ Arvouet-Grand et al. [10] คำนวณหา ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารตัวอย่างจากกราฟ มาตรฐานคอร์ซิน

$$Y = 2.834x + 0.039$$

2.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH Radical Scavenging

เตรียมสารละลายตัวอย่างด้วย 99.9% เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น (500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารละลายมาตรฐาน butylated hydroxytoluene (BHT) ด้วย 99.9% เอทานอล เตรียมความเข้มข้นต่างๆ (500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบและสารมาตรฐาน ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ดัดแปลงจากวิธีการของ Braca, Sortino, Politi, Morelli, & Mendez [11] คำนวณหาค่าคำนวณค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical inhibition%) และ ค่าความเข้มข้นที่สามารถ

ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ 50% (IC₅₀) หาได้จากกราฟเส้นตรงระหว่าง DPPH radical inhibition (%) กับความเข้มข้นของสารสกัด

$$\text{DPPH radical inhibition (\%)} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (1)$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ (กลุ่มควบคุม)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้ BHT เป็น positive control

2.1.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Anti- α -amylase assay)

นำสารละลายมาตรฐานอะคาร์โบส หรือสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ (0.03, 0.05, 0.10, 0.42 และ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ผสมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.9) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ที่ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltatrioside เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เขย่า และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ดัดแปลงจากวิธีการของ Gella et al. [12] หาค่าร้อยละการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (% α -amylase inhibition) จากสูตร

$$\% \alpha\text{-amylase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (2)$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

2.1.6 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

นำสารละลายมาตรฐานอะคาร์โบส หรือสารละลายตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.03, 0.05, 0.10, 0.42 และ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.9) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.9) ที่ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เขย่า และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40.0 ไมโครลิตร นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ดัดแปลงจากวิธีการของ Matsui et al. [13] หาค่าร้อยละการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (% α -glucosidase inhibition) จากสูตร

$$\% \alpha\text{-glucosidase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (3)$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 การสกัดสารสกัดจากพืช

จากการสกัดใบหนานเฉาเหว่ยน้ำหนักจำนวน 2,950 กรัม ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ได้สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยเท่ากับ 341.92 กรัม คิดเป็นร้อยละเท่ากับ 11.59 ของน้ำหนักแห้ง

3.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยด้วย วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยใช้สารละลายมาตรฐานเป็นกรดแกลลิก พบว่า สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 59.03 ± 0.67 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Qing et al. [14] ที่พบว่า ในสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 63.044 ± 2.60 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ซึ่งสารสกัดจากเอทานอลจะให้ปริมาณฟีนอลิกมากกว่าเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น เนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่ละลายได้ง่ายในตัวทำละลายเอทานอล และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของใบหูกวาง ใบสัก ฝักปอปิด และบอระเพ็ด ที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 21.20 ± 3.06 67.45 ± 1.35 31.33 ± 0.82 และ 8.02 ± 1.14 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

3.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) Colorimetric

โดยใช้สารละลายมาตรฐานเป็นเคอร์ซีติน พบว่า สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 22.98 ± 0.21 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 1 และจากการศึกษาของ Omede et al. [15] พบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยเท่ากับ 0.857 ± 0.15 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัด สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดใบสัก ฝักปอปิด ใบหูกวาง และบอระเพ็ด มีค่าเท่ากับ 68.28 ± 1.44 44.78 ± 1.49 38.06 ± 2.11 และ 6.72 ± 0.25 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัด ทั้งนี้เนื่องจากใบหูกวาง ใบสัก ฝักปอปิด และบอระเพ็ด เป็นสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน [16]

3.4ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging โดยใช้สารละลายมาตรฐานคือ BHT พบว่า สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.37 ± 1.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.02 ± 2.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจากใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์โดยวิธีกำจัดอนุมูล DPPH ผลการวิจัยในครั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Omede et al., [15]; Wang et al., [17]; Adeoye et al., [18]; Qing et al., [14] ที่รายงานว่า สารสกัดเอทานอล และเมทานอลของใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์โดยวิธี DPPH radical ของสารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ย¹

สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)	ค่า IC ₅₀ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical (mg/mL)
สารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ย	59.03±0.67	22.98±0.21	9.37±1.31
Positive control (BHT)			10.02±2.46

¹ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหนานเฉาเหว่ยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร [19] ความเข้มข้นหรือขนาดของสารสกัดที่ใช้ และปริมาณของสารปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ย [6]

3.5 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ผลการทดสอบอะคาร์โบส และสารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ย พบว่า สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส มีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 85.35± 0.61 เมื่อนำมาหาค่า IC₅₀ พบว่า สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 10.39±1.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานอะคาร์โบส มีการยับยั้งได้ 92.15±0.39% และมีค่า IC₅₀ 14.08 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลสของสารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยในการวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับการวิจัยของ

Alara et al., [6]; Erukainure et al., [20]; Alara & Abdurahman [21]; ที่พบว่าสารสกัดในเอทานอล และ สารสกัดในบิวทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และ สารโพลีฟีนอลในธรรมชาติสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต

3.6 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส พบว่า สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส มีร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสเท่ากับ 74.39±0.15 เมื่อนำมาหาค่า IC₅₀ พบว่า สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 11.08±0.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานอะคาร์โบส มีการยับยั้งได้ 89.82±1.86 % และมีค่า IC₅₀ 12.47±0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และ เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของสารมาตรฐานอะคาร์โบส ของสารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ย¹

สารตัวอย่าง	เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส		เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส	
	% α-amylase inhibition	IC ₅₀ (mg/mL)	% α-glucosidase inhibition	IC ₅₀ (mg/mL)
สารสกัดจากใบหนานเฉาเหว่ย	85.35±0.61	10.39±1.08	74.39±0.15	11.08±0.76
สารมาตรฐานอะคาร์โบส	92.15±0.39	14.08 ± 0.21	89.82±1.86	12.47±0.46

¹ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ยในการ

วิจัย สอดคล้องกับการวิจัยของ Alara & Abdurahman [21]; Alara et al., [6] ที่พบว่าสารสกัดของเอทานอล สารสกัดน้ำ และสารสกัดของบิวทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ทั้งนี้ฤทธิ์ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสขึ้นอยู่กับปัจจัย เช่น ระยะเวลาในการให้สารสกัด และชนิดของสารสกัดสารสำคัญ [19] อาจเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ด้านเบาหวานของใบหนานเฉาเหว่ย

ผลการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ของสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ย พบว่า สารสกัดของเอทานอลจากใบหนานเฉาเหว่ยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ และการที่สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยจากเอทานอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวทำละลายเอทานอลเป็นสารละลายที่มีความมีขี้ผึ้งมากจะสามารถดึงสารละลายที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ดี [6] สารสกัดของเอทานอลจากใบหนานเฉาเหว่ยสามารถออกฤทธิ์ด้านเบาหวานโดยสามารถชะลอการดูดซึมหรือป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด โดยจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดส [26] เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแป้งได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ทำให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือดลดลง หรือความเข้มข้นของน้ำตาลไม่สูงเกินไปจนเกิดภาวะอันตราย ซึ่งจากการทดลองมีข้อมูลที่น่าสนใจสนับสนุนการค้นพบของ Ejike et al. [22] ซึ่งรายงานว่า สารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยสามารถที่จะลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ผลการทดลองนี้สามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบหนานเฉาเหว่ยไปใช้ในการศึกษาทางการแพทย์

ต่อไป เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ทั้งนี้ในการบริโภคสารสกัดใบหนานเฉาเหว่ยควรอยู่ในการดูแลของแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ โดยเฉพาะผู้ป่วย ผู้ที่มีโรคประจำตัว ซึ่งควรระมัดระวังเป็นพิเศษ

4. สรุป

ผลจากการศึกษา เมื่อทำการสกัดใบหนานเฉาเหว่ยด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จะได้รับยาละสารสกัดเท่ากับ 11.59 ของน้ำหนักแห้ง พบว่า สารสกัดหยาบใบหนานเฉาเหว่ย มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดนี้ไปทำการวิจัยหรือเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดลองต่อทางคลินิก เพื่อเป็นแนวทางไปสู่การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการรักษาโรคที่สัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ รวมทั้งโรคเบาหวาน ดังนั้น การใช้หนานเฉาเหว่ยจึงต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณชุมชนตำบลตาพระยา จังหวัดสระแก้ว ที่ให้ความอนุเคราะห์พืชตัวอย่าง และให้ข้อมูลภูมิปัญญาพื้นบ้านการใช้พืชตัวอย่างนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] N. Zainul, N. F. N. Hassan, Y. Zakaria, and H. Muhammad, "In vivo antidiabetic efficacy

- of Malaysian *Vernonia amygdalina* aqueous extract,” *Journal of Medicinal Plants Studies*, vol. 6, no. 4, pp. 72-77, Jul. 2018.
- [2] N. Yunitasari, R. T. Swasono, H. D. Pranowo, and T. J. Raharjo, “Phytochemical screening and metabolomic approach based on Fourier transform infrared (FTIR): Identification of α -amylase inhibitor metabolites in *Vernonia amygdalina* leaves,” *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 26, no. 6, p. 101540, Jun. 2022.
- [3] N. J. Toyang and R. Verpoorte, “A review of medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae).” *Journal Ethnopharmacology*, vol. 146, no. 3, pp. 681-723, Apr. 2013.
- [4] 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,” *Journal of Pharmaceutical Research International*, vol. 21, no. 5, pp. 1-8, 2018.
- [5] 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, no. 4, pp. 190-200, Nov. 2020.
- [6] 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, no. 1, pp. 414-422, Feb. 2019.
- [7] S. B. Nimse, and D. Pal, “Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms,” *RSC Advances*, vol. 5, no. 35, pp. 27986-28006. Mar. 2015.
- [8] K. Nowotny, T. Jung, A. Höhn, D. Weber, and T. Grune, “Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus,” *Biomolecules*, vol. 5, no. 1, pp. 194-222, Mar. 2015.
- [9] L. Majhenic, M. Skerget, and Z. Knez, “Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts,” *Food Chemistry*, vol. 104, no. 3, pp. 1258-1268, 2007.
- [10] A. A. Grand, B. Vennat, A. Pourrat, and P. Legret, “Standardization of propolis extract and identification of principal constituents,” *Journal de Pharmacie de Belgique*, vol. 49, no. 6, pp. 462-468, Nov-Dec. 1994.
- [11] A. Braca, C. Sortino, M. Politi, I. Morelli, and J. Mendez, “Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 79, no. 3, pp. 379-381, Mar. 2002.
- [12] F. J. Gella, G. Gubern, R. Vidal, and F. Canalias, “Determination of total and pancreatic α -amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotrioxide as substrate,” *Clinica*

- Chimica Acta*, vol. 259, no. 1-2, pp. 147-160, Mar. 1997.
- [13] T. Matsui, C. Yoshimoto, K. Osajima, T. Oki, and Y. Osajima, "In vitro survey of alpha-glucosidase inhibitory food components," *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 60, no. 12, 2019-2022.
- [14] F. R. Qing, M. Elumalai, and G. Akowuah, "Antimicrobial and antioxidant studies of *Vernonia amygdalina*," *Journal of Applied Pharmacy*, vol. 6, no. 4, pp. 360-371, Nov. 2014.
- [15] A. Omede, M. S. Suleiman, F. O. Atanu, S. Momoh, E. T. Friday, V. D. Sheneni, and E. R. Jegede, "Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of *Vernonia Amygdalina*," *International Journal of Cell Science & Molecular Biology*, vol. 4, no. 4, pp. 81-86, May. 2018.
- [16] N. Huayhongthong, "Phytochemical screening and biological activity of some Thai medical plants using in the diabetes therapy," M.S. thesis, Burapha Univ., Chonburi, Thailand, 2016.
- [17] 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.
- [18] A. T. Adeoye, T. O. Ajibade, A. A. Oyagbemi, T. O. Omobowale, A. D. Adedapo, A. E. Ayodele, M. A. Yakubu, and A. A. Adedapo, "The methanol leaf extract of *Vernonia amygdalina* ameliorates cardiomyopathy in alloxan-induced diabetic rats," *Ornamental and Medicinal Plants*, vol. 1, no. 2, pp. 26-48, Dec. 2017.
- [19] 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, no. 4, pp. 3428-3434, Dec. 2013.
- [20] 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, no. 3, pp. 721-732, Jan. 2019.
- [21] O. R. Alara and N. H. Abdurahman, "Anti-diabetic activity and mineral elements evaluation of *Vernonia amygdalina* leaves obtained from Malaysia," *Journal of Research in Pharmacy*, vol. 23, no. 3, pp. 514-521, Feb. 2019.
- [22] C. E. C. C. Ejike, S. O. Awazie, P. A. Nwangozi, and C. D. Godwin, "Synergistic postprandial blood glucose modulatory properties of *Vernonia amygdalina* (Del.), *Gongronema latifolium* (Benth.) and *Occimum gratissimum* (Linn.) aqueous decoctions," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 149, no. 1, pp. 111-116, Aug. 2013.