

# ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากวัชพืชบางชนิด

## Antioxidant Capacity of Some Weed Crude Extracts

จุฑามาศ เมรसनัด<sup>1</sup> วนิดา สืบสายพรหม<sup>2</sup> ทศพล พรพรหม<sup>1</sup> และ จำเนียร ชมภู<sup>1\*</sup>

Jutamas Merasanud<sup>1</sup>, Wanida Suebsaiprom<sup>2</sup>, Tosapon Pornprom<sup>1</sup>

and Jamnian Chompuo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>1</sup>Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup>ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

\*Corresponding author: Email: agrjnc@ku.ac.th

(Received: 25 January 2018; Accepted: 30 April 2018)

**Abstract:** Utilization of weeds as medicinal plants is an alternative weed control and valued added. The objectives of this study were to determine phytochemical contents and investigate antioxidant activity of crude extracts from leaf of nine weed species including *Bidens pilosa* L., *Eclipta prostrata* L., *Borreria laevis* (Lam.) Griseb, *Tribulus cistoides* L., *Limnocharis flava* (L.) Buchenau, *Amaranthus spinosus* L., *Vernonia cinerea* (L.) Less, *Cleome viscosa* L. and *Phyllanthus niruri* L. Dry leaves were homogenized to powder and then extracted with an aqueous comparing with ethanol (80%). Phytochemical contents viz. phenolics and flavonoids of sample extracts were analyzed and antioxidant capabilities using 2,2-diphenyl-1-picryl-1-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazole-6-sulphonic acid (ABTS), phenazine methosulfate- nicotinamide adenine dinucleotide (PMS-NADH) and nitric oxide radical scavengings were tested. The results showed that ethanolic extracts from all weed species had greater phenolic and flavonoid contents than aqueous extracts. We found that ethanolic extracts of *B. laevis* and *P. niruri* had higher in both phytochemical contents than the others. Moreover, ethanolic extracts of *B. laevis* and *P. niruri* had greater inhibiting DPPH ( $IC_{50}$  = 58.69 and 89.90  $\mu$ g/mL, respectively) and ABTS radical scavenging ( $IC_{50}$  = 96.63 and 113.58  $\mu$ g/mL, respectively) than the others. Furthermore, ethanolic extract of *B. laevis* has similar activity to tocoperol ( $IC_{50}$  = 51.65  $\mu$ g/mL) against DPPH radical scavenging. In case of inhibiting PMS-NADH and nitric oxide scavengings, the effects of all leaf extracts from weeds were not pronounced. However, further research on identification of chemical compounds from *B. laevis* and *P. niruri* extracts should be conducted.

**Keywords:** Weed, phytochemical, antioxidant

**บทคัดย่อ:** การนำวัชพืชมาใช้เป็นประโยชน์เพื่อเป็นยาสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมวัชพืช และเป็นการเพิ่มมูลค่า การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมีและทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบของวัชพืช จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ก้านจ้ำขาว กะเม็ง เขมรเล็ก โคกกระสุน ตาลปัตรฤๅษี ผักโขมหนาม ผักละออง ผักเสี้ยนผี และลูกใต้ใบ โดยนำส่วนของใบวัชพืชอบให้แห้ง และบดละเอียด สกัดด้วยน้ำด้วยน้ำเปรียบเทียบกับเอทานอล (80%) แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ สารประกอบพวก phenolics และ flavonoids และทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยปฏิกิริยา DPPH, ABTS, PMS-NADH และ nitric oxide radical scavengings ผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากวัชพืชทุกชนิดมีปริมาณของสารพฤกษเคมีพวก phenolics และ flavonoids มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ โดยที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากเขมรเล็กและลูกใต้ใบมีปริมาณสารพฤกษเคมีทั้งสองชนิดนี้มากกว่าสารสกัดจากวัชพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากเขมรเล็กและลูกใต้ใบมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา DPPH ( $IC_{50}$  เท่ากับ 58.69 และ 89.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และ ABTS radical scavengings ( $IC_{50}$  เท่ากับ 96.63 และ 113.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ได้สูงกว่าสารสกัดจากวัชพืชอื่น โดยที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากเขมรเล็กสามารถยับยั้งปฏิกิริยา DPPH radical scavenging ได้ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน tocopherol ( $IC_{50}$  เท่ากับ 51.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนประสิทธิภาพของสารสกัดจากวัชพืชทดสอบในการต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา PMS-NADH และ nitric oxide radical scavenging นั้นมีผลการทดลองไม่เด่นชัดมากนัก อย่างไรก็ตามจะทำการศึกษานิตของสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากเขมรเล็ก และลูกใต้ใบต่อไป

**คำสำคัญ:** วัชพืช พฤกษเคมี ต้านอนุมูลอิสระ

## คำนำ

การเกิดโรคภัยไข้เจ็บของมนุษย์มีสาเหตุมาจากการเสื่อมสภาพของเซลล์ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้จากอนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดขึ้นภายในและนอกร่างกายของมนุษย์ (Ames *et al.*, 1993) อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากมลพิษ ควันบุหรี่ ความเครียด ความเจ็บป่วย แม้กระทั่งการออกกำลังกายก็สามารถเพิ่มการรับสารอนุมูลอิสระได้ โดยที่การรับอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเมื่อร่างกายนำออกซิเจนเข้าไปใช้ มีผลต่อกระบวนการชรา และการเกิดโรคในมนุษย์ (Percival, 1998) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) มีบทบาทสำคัญในการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของอนุมูลอิสระของ oxygen (reactive oxygen species; ROS) ที่จะเกิดขึ้นกับ lipid, protein และ DNA ในร่างกายของมนุษย์ (Sharma *et al.*, 2012) จากผลการวิจัยทางด้านเภสัชวิทยารายงานว่า สารพฤกษเคมี (phytochemical) ซึ่งเป็นสารเคมีตามธรรมชาติที่พบในพืช มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ทั้งนี้สารประกอบพวก phenolics และ flavonoids

เป็นกลุ่มสารที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เพราะสารกลุ่มนี้มีสรรพคุณทางยาหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Ghasemzadeh *et al.*, 2010) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดเป็นส่วนประกอบที่สะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด โดยปริมาณของสารจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์พืช การจัดการแปลง สภาพแวดล้อม และวิธีการสกัดสาร (King and Young, 1999)

วัชพืช (weeds) เป็นพืชที่มีคุณสมบัติโตเร็ว สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี และมีการขยายพันธุ์ได้จำนวนมากและรวดเร็ว จัดเป็นศัตรูพืชสำคัญที่สามารถแก่งแย่งปัจจัยที่ใช้ในการเจริญเติบโตกับพืชปลูก ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพผลผลิตของพืชปลูกที่ลดลง ทำให้เกษตรกรมีต้นทุนเพิ่มขึ้นในการจัดการวัชพืชในแปลงปลูก (พรชัย, 2540) ในทางกลับกันวัชพืชบางชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้วัชพืชหลายชนิดยังมีรายงานสรรพคุณทางเภสัชวิทยาสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นยา

สมุนไพร ตัวอย่างเช่น ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens*) มีรายงานว่าพืชชนิดนี้มีสรรพคุณในการแก้อักเสบ ด้านโรคเบาหวาน และสามารถนำมาใช้เป็นยาชาระงับความรู้สึกได้ (Beck *et al.*, 2018) ส่วน Zalke *et al.* (2013) รายงานว่า โคกกระออม (*Cardiospermum halicacabum*) สามารถนำมาใช้เป็นยาสำหรับลดอาการปวดเมื่อย รักษาอาการไขข้ออักเสบ บรรเทาอาการระคายเคือง และมีฤทธิ์เป็นยาชา ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากวัชพืชนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมวัชพืชและเป็นการสร้างรายได้ให้กับเกษตรกร จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในวัชพืช พบว่าวัชพืชหรือพืชมีสารพฤกษเคมี (phytochemicals) มากมายที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) (โอบา, 2549) ซึ่งสารในกลุ่ม polyphenolic, flavonoids, carotenoids, tocopherols และ ascorbic acid เป็นสารพฤกษเคมีกลุ่มที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (Sexena *et al.*, 2013) การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี และทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากวัชพืช จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ก้านจ้ำขาว กะเม็ง เขมรเล็ก โคกกระสุน ตาลปัตรฤาษี ผักโขมหนาม ผักละออง ผักเสี้ยนผี และลูกใต้ใบ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างวัชพืช

ตัวอย่างวัชพืช จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ก้านจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.) กะเม็ง (*Eclipta prostrata* L.) เขมรเล็ก (*Borreria laevis* (Lam.) Griseb) โคกกระสุน (*Tribulus cistoides* L.) ตาลปัตรฤาษี (*Limnocharis flava* (L.) Buchenau) ผักโขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) ผักละออง (*Vernonia cinerea* (L.) Less) ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* L.) และ ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri* L.) เก็บจากพื้นที่ทั่วไปในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำส่วนของวัชพืช ล้างน้ำให้สะอาด นำไปอบแห้งในตู้อบแห้งแบบลมร้อน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผง

บดละเอียดค้ำยแบ่งด้วยเครื่องบด นำตัวอย่างวัชพืชบดละเอียดแช่ในตัวทำละลาย อัตรา 1:10 (กรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับการสกัดด้วยน้ำ ทำการสกัดโดยวิธีการต้มเดือด นาน 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ส่วนสกัดด้วยเอทานอล ทำการสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยแช่ตัวอย่างวัชพืชบดละเอียดในเอทานอล 80% อัตราส่วนดังกล่าวข้างต้น วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 หลังจากนั้นนำสารละลายจากวัชพืชไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator ที่ภาวะควบคุมอุณหภูมิ 50°C ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)

### 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี

#### 2.1 ปริมาณสาร total phenolics

เตรียมสารละลายตัวอย่างด้วยการละลายสารสกัดหยาบจากวัชพืชด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล 80% ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณของ total phenolics โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent ตามวิธีของ Kahkonen *et al.* (1999) สารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมน้ำ 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม 50 ไมโครลิตร ของ Folin-phenol reagent (อัตราส่วน 1:1; reagent: water) และ 80 ไมโครลิตร ของ sodium carbonate (7.5%) เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำไปวางไว้ในที่มืด หลังจาก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (GAE) เมื่อ  $y = 0.004x + 0.087$  ( $R^2 = 0.994$ ) มีหน่วยเป็น mg GAE/ g extract

#### 2.2 ปริมาณสารพวก flavonoids

วิเคราะห์ปริมาณของ total flavonoids ตามวิธีของ Djeridane *et al.* (2006) นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงใน 96-well plate เติมน้ำ 200 ไมโครลิตร ของสารละลาย aluminium chloride (2%) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ rutin (Ru) เมื่อ  $y = 0.007x - 0.003$  ( $R^2 = 0.999$ ) มีหน่วยเป็น mg RE/g extract

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยา DPPH radical scavenging

ทำการทดลองตามวิธีของ Boskou *et al.* (2006) เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ sodium acetate buffer (pH 5.5) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปไว้ในที่มีด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับน้ำและเอทานอล 80% โดยใช้ tert-butyl hydroxytoluene (BHT) และ tocopherol เป็นสารมาตรฐานหรือ positive control

#### 3.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยา ABTS radical scavenging

ผสมสารละลาย 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) กับ potassium persulfate (ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมล) นำไปไว้ในที่มีด อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา oxidation อย่างสมบูรณ์ ได้เป็น  $ABTS^{\bullet+}$  หลังจากนั้น 16 ชั่วโมง นำสารละลายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง  $0.700 \pm 0.050$  ใส่สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากตัวอย่างพืชความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย  $ABTS^{\bullet+}$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับน้ำและเอทานอล 80% โดยใช้ BHT และ tocopherol เป็นสารมาตรฐาน (Hsu *et al.*, 2011)

#### 3.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยา PMS-NADH system superoxide-radical scavenging

เตรียมสารผสมของ nicotinamide adenine dinucleotide-reduced (NADH) (ความเข้มข้น 105 ไมโครโมล) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ nitro blue tetrazolium (NBT) (ความเข้มข้น 66 ไมโครโมล) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ละลายใน phosphate buffer (ความเข้มข้น 0.1 โมล pH เท่ากับ 7.4) และสารสกัดจากตัวอย่างพืชที่ความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสาร phenazine methosulfate (PMS) (ความเข้มข้น 30 ไมโครโมล) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับน้ำและเอทานอล 80% โดยใช้ BHT และ tocopherol เป็นสารมาตรฐาน (Lau *et al.*, 2002)

#### 3.4 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยา Nitric oxide radical scavenging

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging ด้วย Griess Illosvoy reaction ตามวิธีของ Govindarajan *et al.* (2004) นำสารผสม 300 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย sodium nitroprusside (SNP) (10 mM, 200 ไมโครลิตร) phosphate buffer saline (50 ไมโครลิตร) และสารสกัดจากพืชความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (50 ไมโครลิตร) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 150 นาที เติม sulfanilic acid reagent (0.33% ใน acetic acid (20%)) หลังจากนั้น 5 นาที ใส่ N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDH) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับน้ำ โดยใช้ BHT และ tocopherol เป็นสารมาตรฐานหรือ positive control

คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา DPPH, ABTS, PMS-NADH และ nitric oxide radical scavenging จากสูตรดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[(OD_{\text{ชุดควบคุม}} - OD_{\text{ตัวอย่าง}}) / OD_{\text{ชุดควบคุม}}] \times 100}$$

เมื่อ  $OD_{\text{ชุดควบคุม}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำและเอทานอล 80%

$OD_{\text{ตัวอย่าง}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง และ positive control

#### 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 6 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

### ผลการศึกษาและวิจารณ์

#### 1. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

สารฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารประกอบทางเคมีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติซึ่งพบได้ในพืชเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์ (Hasler and Blumberg, 1999) จากรายงานการวิจัยต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าพืชหลายชนิดเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยสาร

ต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น polyphenolics, flavonoids, carotenoids, tocopherol และ ascorbic acid (Saxena *et al.*, 2013) จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ได้แก่ phenolics และ flavonoids จากสารสกัดหยาบด้วยน้ำและเอทานอลของวัชพืชทั้ง 9 ชนิด (ตารางที่ 1) พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากลูกใต้ใบและเขมรเล็กมีปริมาณสาร phenolics สูงที่สุดแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวัชพืชชนิดอื่น ๆ รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบ และสารสกัดด้วยเอทานอลจากกันจ้ำขาว ตามลำดับ ส่วนปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ จะพบในสารสกัดด้วยเอทานอลจากเขมรเล็กมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทานอลจากผักโขมหนาม นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างวัชพืชชนิดเดียวจากการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล พบว่าตัวอย่างของวัชพืชที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ phenolics และ flavonoids มากกว่าการสกัดด้วยน้ำจากคุณสมบัติของสารประกอบพวก phenolics และ flavonoids เป็นสารประกอบที่มีความเป็นขั้วปานกลางถึงสูง จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง ละลายในน้ำได้เล็กน้อย และจะละลายได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Pokorny *et al.*, 2001) ซึ่ง Fayaz *et al.* (2017) รายงานว่า น้ำเป็นตัวทำละลายสารในกลุ่ม alkaloid และ glycoside ได้ดี ส่วนเอทานอลจะมีประสิทธิภาพที่ดีใน

Table 1. Total phenolic and flavonoids contents of crude extracts from nine weed species

Weed species	Total phenolic content (GAE mg/g extract)		Total flavonoid content (Ru mg/g extract)	
	Aqueous extract	Ethanollic extract	Aqueous extract	Ethanollic extract
<i>Bidens pilosa</i> L.	31.57 ± 1.57 e <sup>1</sup>	54.50 ± 2.41 c	7.58 ± 0.76 f	87.82 ± 8.87 c
<i>Eclipta prostrata</i> L.	8.07 ± 0.09 i	44.17 ± 0.19 d	3.67 ± 0.33 f	74.98 ± 3.65 d
<i>Borreria laevis</i> (Lam.) Griseb	3.79 ± 0.36 j	95.17 ± 1.15 a	0.29 ± 0.29 f	171.79 ± 6.86 a
<i>Tribulus cistoides</i> L.	12.52 ± 0.54 h	29.57 ± 1.55 e	3.35 ± 0.02 f	55.29 ± 1.20 e
<i>Limnocharis flava</i> (L.) Buchenau	14.12 ± 0.36 gh	29.05 ± 0.93 e	8.94 ± 0.04 f	51.95 ± 2.74 e
<i>Amaranthus spinosus</i> L.	14.14 ± 0.03 gh	25.21 ± 0.65 f	6.00 ± 0.88 f	75.17 ± 4.83 d
<i>Vernonia cinerea</i> (L.) Less	16.12 ± 0.11 g	31.19 ± 1.07 e	0.77 ± 0.14 f	76.00 ± 7.08 d
<i>Cleome viscosa</i> L.	23.36 ± 1.27 f	30.39 ± 1.05 e	4.21 ± 0.23 f	68.86 ± 2.88 d
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	78.98 ± 0.14 b	96.64 ± 4.10 a	55.13 ± 3.04 e	148.69 ± 5.03 b

<sup>1</sup> The data represent the mean ± SD of four determinations. Values with the same letter are not significantly different (P=0.01) from each other

การสกัดสารพวก sterol, flavonoid, phenolic และ alkaloid เช่นเดียวกับ Liu *et al.* (2011) รายงานว่า methanol และ ethanol สามารถละลายสารที่มีสภาพเป็นขี้ผึ้งได้ดี เช่น สารพวก sugar, amino acid, phenolics, aglycon flavonoid, anthocyanin, terpenoid, sponin, tanin, xanthoxilin, totarol, quacinoind, lacton, flavone, phenone และ polyphenol ในขณะที่น้ำจะมีประสิทธิภาพในการสกัดสารพวก glycoside, amino acid และ sugar ได้ดี (Dehkharghanian *et al.*, 2010) ส่วน Visht and Chaturvedi (2012) รายงานว่า ตัวทำละลายที่ดีควรมีค่าความเป็นขี้ผึ้งที่เหมาะสมกับตัวถูกละลาย และมีความหนืด (viscosity) ต่ำ เพื่อให้มีการไหลเวียนภายในเซลล์พืชที่ดี และเป็นกรดลดความหนาแน่นของตัวถูกละลายที่อยู่โดยรอบเซลล์ ซึ่งน้ำมีหมู่ hydroxyl อยู่ในโมเลกุลเป็นจำนวนมาก การแทรกซึมของตัวทำละลายจึงเกิดได้ดีขึ้น แต่มักใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอื่น ๆ ในสัดส่วนที่เหมาะสม เพื่อช่วยในการแทรกซึมของตัวทำละลายเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ดังนั้นตัวทำละลายผสมของน้ำกับเอทานอลจึงดีกว่าการใช้น้ำหรือเอทานอลเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ King and Young (1999) ยังรายงานว่ สารพฤกษเคมีที่สามารถพบในพืชจะมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด พันธุ์ ขึ้นส่วนของพืช การเพาะปลูก และวิธีการสกัด โดยที่ รัตนา และคณะ (2560) พบว่า ปัจจัยในการสกัด ได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของพืชต่อน้ำ อุณหภูมิในการสกัด และเวลาในการสกัด มีผลต่อความเข้มข้นของสารพวก anthocyanin ที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ซึ่ง Arya *et al.* (2012) พบว่า การสกัดใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) ด้วยเอทานอลและไฮโดรเอทานอลจะมีปริมาณของสารพวก alkaloids, sponins, crbohydrates, tannin และ flavonoids สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารทำละลายอื่น เช่น บีโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และน้ำ จากการเปรียบเทียบปริมาณ สารพฤกษเคมีจากใบของ *Sarracenia purpurea* ที่สกัดด้วยการต้มน้ำให้เดือดกับเอทานอล 80% พบว่า สารสกัดจากใบของพืชนี้ด้วยเอทานอลมีปริมาณของสารพวก phenolics สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ

## 2. การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยน้ำและเอทานอลจากวัชพืชทั้ง 9 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับต้านปฏิกิริยา DPPH, ABTS, PMS-NADH และ nitric oxide radical scavengings ผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากกันจ้ำขาว และลูกใต้ใบ และสารสกัดด้วยเอทานอลจากกันจ้ำขาว กะเม็ง เขมรเล็ก โคกกระสุน ตาลปัตรฤๅษี ผักเสี้ยนผี และลูกใต้ใบ สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ stable radical DPPH<sup>•</sup> ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1A) ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา ABTS radical scavenging พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากกันจ้ำขาว ผักเสี้ยนผี และลูกใต้ใบ และสารสกัดด้วยเอทานอลจากกันจ้ำขาว กะเม็ง เขมรเล็ก โคกกระสุน ผักเสี้ยนผี และลูกใต้ใบ มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ ABTS<sup>•+</sup> ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1B)

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา oxidation ของสารในระบบ PMS-NADH ได้เป็นอนุมูลอิสระของ superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) พบว่าวัชพืชทั้ง 9 ชนิด ที่สกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยา PMS-NADH ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลไม่พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านการเกิด  $O_2^{\bullet-}$  โดยที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา PMS-NADH radical scavenging ของสารสกัดด้วยน้ำจากวัชพืชทั้ง 9 ชนิดนี้อยู่ในช่วง 3.70-17.46 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1C) นอกจากนี้ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ  $NO^{\bullet}$  พบว่า สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากวัชพืชทั้ง 9 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging อยู่ใน ช่วง 3.49-33.61 เปอร์เซ็นต์ โดยที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากวัชพืชเกือบทุกชนิดที่ใช้ทดสอบมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ  $NO^{\bullet}$  ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ยกเว้น สารสกัดจากผักโขม ผักละออง และลูกใต้ใบ (ภาพที่ 1D)

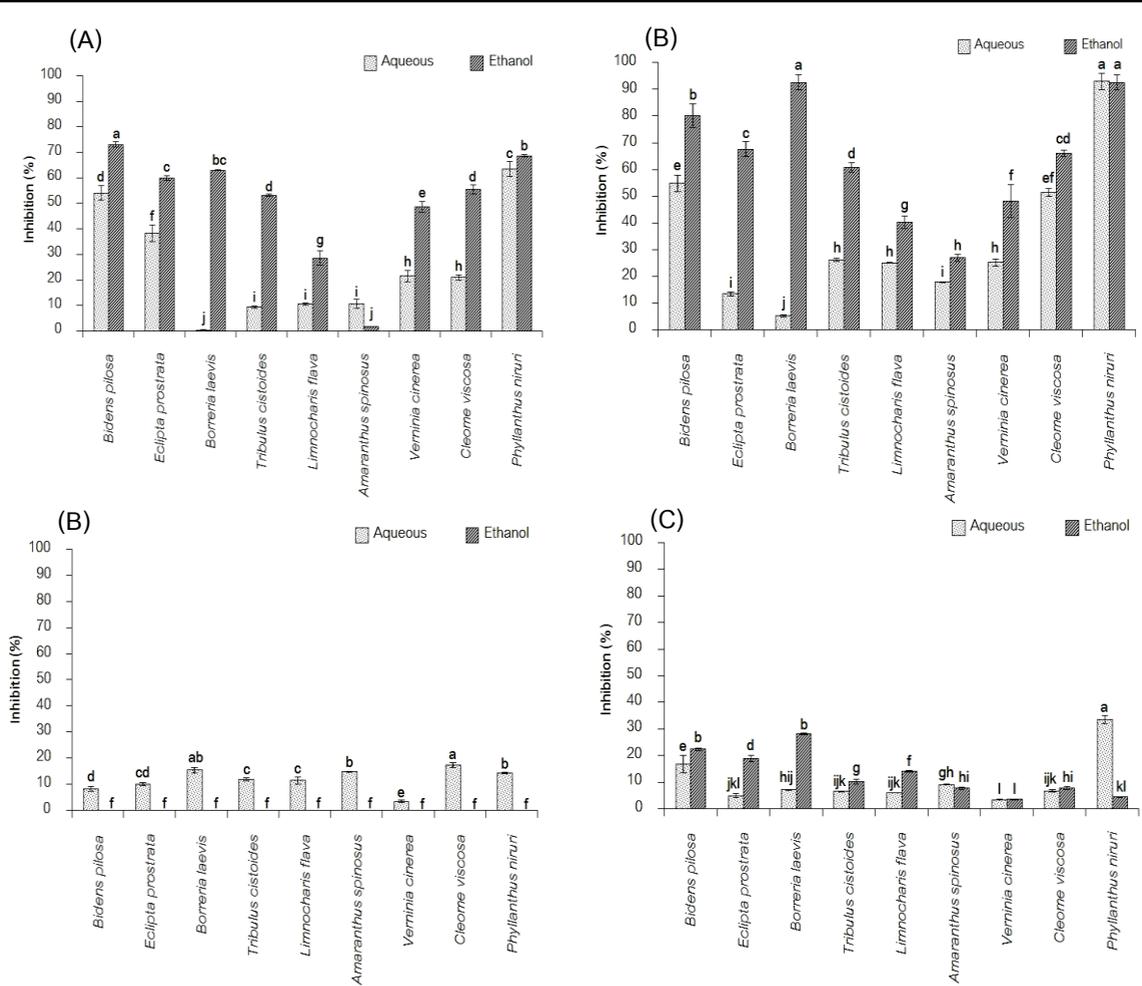


Figure 1. Percent inhibition of aqueous and ethanol extracts from nine weed species at concentration of 500 µg/mL on DPPH (A), ABTS (B), PMS-NADH (C) and nitric oxide (D) radical scavengings

เมื่อทราบผลการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากวัชพืช 9 ชนิด จึงนำสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ (the half maximal inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ tocopherol ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา DPPH radical scavenging พบว่า สารสกัดหยาบจากวัชพืชส่วนใหญ่ที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH<sup>•</sup> ได้ต่ำกว่าสารมาตรฐาน BHT และ

tocopherol ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 23.26 และ 51.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ยกเว้น สารสกัดด้วยเอทานอลจากเขมรเล็ก (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 58.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ของอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน tocopherol (ภาพที่ 2A) สำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากวัชพืชชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา ABTS radical scavenging พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบของเขมรเล็ก และลูกใต้ใบ มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติในการต้านอนุมูลอิสระของ ABTS<sup>•+</sup> ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด

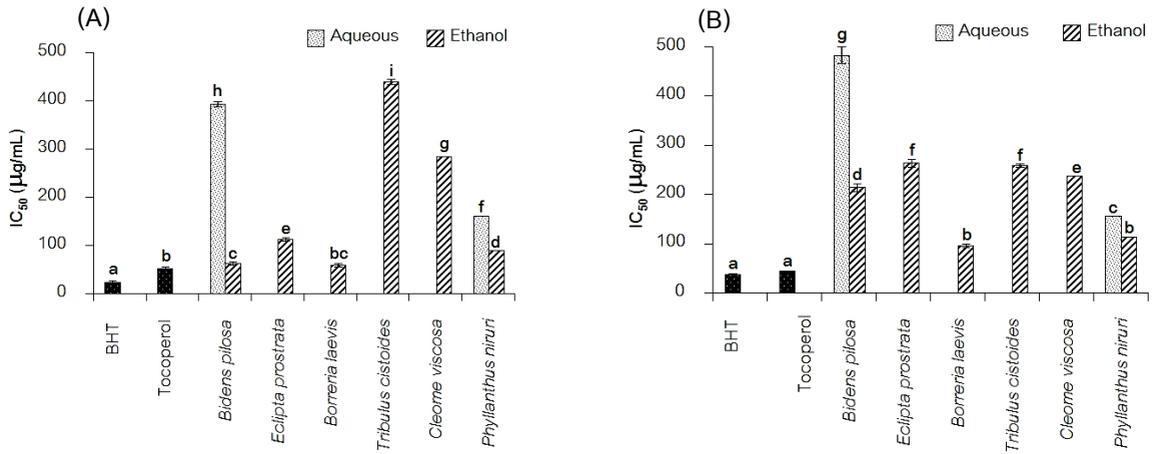


Figure 2. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of aqueous and ethanolic extracts of nine weed species by DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging radicals

จากวัชพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 96.63 และ 113.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากวัชพืชทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ต่ำกว่าสารมาตรฐาน BHT และ tocoperol ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 36.89 และ 44.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2B) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเอทานอลของวัชพืชทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> และ ABTS<sup>•+</sup> ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dhanani *et al.* (2017) พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Withania somnifera* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา DPPH และ ABTS มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และจากการศึกษาของ Bae *et al.* (2012) พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Rumex acetosa* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา DPPH radical scavenging และ NO production ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ในทางกลับกัน Joel *et al.* (2017) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากผลของ *Tetrapleura tetraptera* พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากผลของพืชชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา ABTS, ferric antioxidant potential (FRAP), DPPH, nitric oxide, anti-lipid peroxidation และ metal

chelating ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณของ total phenolic สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล

จากการศึกษาชนิดสารพฤกษเคมีที่เป็นส่วนประกอบในเขมรเล็กของ Noiarsa *et al.* (2007) พบ สาร asperulosidic acid, kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-rutinoside, quercetin 3-O-β-D-galactopyranoside และ rutin นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าสารประกอบพวก alkaloids, iridoids, flavonoids และ terpenoids โดยที่พืชชนิดนี้ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคมาลาเรีย ท้องร่วงและระบบทางเดินอาหารอื่น ๆ ปัญหาโรคผิวหนัง ปวดศีรษะ เหงือกอักเสบ รักษาโรคมะเร็ง ต้านจุลินทรีย์บางชนิด ต้านอนุมูลอิสระ รักษาอาการผดผื่นคันของตับ (Conserva and Ferreira, 2012) ส่วนลูกใต้ใบมีรายงานพบสารประกอบพวก tannins เช่น geraniin, corilagin, 1,6-digalloylglucopyranoside rutin, quercetin-3-O-glucopyranoside, amarulone, phyllanthusiin D และ amaritin (Foo, 1993; Foo and Wong, 1992) สารประกอบพวก alkaloids ได้แก่ isobubbialine และ epibubbialine (Houghton *et al.*, 1996) ซึ่งมีการนำลูกใต้ใบมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้เป็นยาแก้ท้องเสีย แก้โรคบิด อาการท้องมาน โรคดีซ่าน นอกจากนี้ยังใช้เป็นยารักษา

โรคหนองใน โรคเบาหวาน โรคบิดเรื้อรัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถใช้สำหรับรักษาผิวหนังที่เป็นแผล ปวดบวม และมีอาการคัน แก้วรอยพริ้วๆ แผลพุพอง กลากเกลื้อน โดยที่ส่วนต่างๆ จะใช้รักษาอาการดังนี้ ต้นอ่อนของลูกใต้ใบสามารถใช้รักษาโรคบิดเรื้อรัง ส่วนของใบสดสามารถใช้รักษาแผลและใช้รักษากลากเกลื้อนบนผิวหนัง ส่วนของน้ำคั้นใช้แก้ปัญหามีสิว ส่วนรากใช้แก้อาการปวดท้อง สำหรับส่วนดอกสามารถใช้เป็นยาทาภายนอกแก้พิษงูกัด (Adegoke *et al.*, 2010; Chandewar and Dhongade 2013; Patel *et al.*, 2011) จากการศึกษาของ Szakiel *et al.* (2010) รายงานว่า ปัจจัยทางสภาพแวดล้อม เช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ ชนิดและองค์ประกอบของดิน มีผลกระทบต่อชนิด คุณภาพ และปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในพืช ซึ่งพืชชนิดเดียวกันแต่มีการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจะมีการสร้างสารฟลาโวนอยด์ได้ต่างชนิดและมีปริมาณที่ต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Liu *et al.* (2015) ที่รายงานว่า ชนิด ปริมาณ และสัดส่วนของสารฟลาโวนอยด์ในพืชขึ้นอยู่กับลักษณะทางภูมิอากาศ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ความชื้น ที่จะช่วยสนับสนุนให้พืชสามารถสร้างสารฟลาโวนอยด์มากขึ้น ซึ่งพบว่าปัจจัยทางภูมิอากาศนี้มีผลกระทบต่อการสร้างสารดังกล่าวได้มากกว่าปัจจัยทางดิน นอกจากนี้ Radušienė *et al.* (2012) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มแสงต่อการสะสมสารฟลาโวนอยด์ในพืช *Hypericum perforatum* พบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์จะมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมและช่วงระยะเวลาของการเจริญเติบโตของพืช โดยที่สภาพที่อุณหภูมิและความเข้มแสงสูงพืชชนิดนี้จะมีการสะสมสารฟลาโวนอยด์สูง และมีการสะสมสารมากในระยะเวลาการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น ดังนั้นการจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากใบของเขมรเล็ก และลูกใต้ใบ ที่ใช้สำหรับการทดลองนี้จึงควรมีการศึกษาต่อไป

## สรุป

สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบของเขมรเล็ก และลูกใต้ใบ มีสารฟลาโวนอยด์พวก phenolics และ flavonoids ปริมาณที่สูง จึงส่งผลให้สารสกัดด้วยเอทานอลจากวัชพืช

ทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา DPPH และ ABTS radical scavenging ได้สูงกว่าสารสกัดจากวัชพืชชนิดอื่น

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ โครงการทุนการศึกษาระดับปริญญาโท ภาควิชาพืชไร่ นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนอุดหนุนงานวิจัยพืชไร่ นา 2561 ซึ่งเป็นโครงการสนับสนุนและส่งเสริมการวิจัยของภาควิชาพืชไร่ นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มอบทุนอุดหนุนสำหรับการทำงานวิจัยนี้

## เอกสารอ้างอิง

- พรชัย เหลืองอากาศพงศ์. 2540. วัชพืชศาสตร์. โรงพิมพ์ลินคอร์น, กรุงเทพฯ.
- รัตนา ม่วงรัตน์ กรรณิการ์ เรือนหล้า และ ธัญชนกกันทวงศ์. 2560. ปัจจัยที่มีผลต่อสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด. วารสารเกษตร 33(1): 141-151.
- โสภา วัชรศุภรัตน์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. สำนักพิมพ์พี.เอส.พี.รีน, กรุงเทพฯ.
- Adegoke, A.A., P.A. Iberi, D.A. Akinpelu and P. Aiyegoro. 2010. Studies on phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Phyllanthus amarus* against multiple antibiotic resistant bacteria. International Journal of Applied Research in Natural Products 3(3): 6-12.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and T.M. Hagen. 1993. Review: oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radicals). Proceedings of

- the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 7915-7922.
- Arya, V., N. Thakur and C.P. Kashyap. 2012. Preliminary phytochemical analysis of the extracts of *Psidium* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(1): 1-5.
- Back, S., H. Mathison, T. Todorov, E.A. Calderón-Juárez and O.R. Kopp. 2018. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Tridax procumbens* (L.). *Journal of Plant Science* 7(1): 19-35.
- Bae, J.Y., Y.S. Lee, S.Y. Han, E.J. Jeong, M.K. Lee, J.Y. Kong, D.H. Lee, K.J. Cho, H.S. Lee and M.J. Ahn. 2012. A comparison between water and ethanol extracts of *Rumex acetosa* for protective effects on gastric ulcers in mice. *Biomolecules and Therapeutics* 20(4): 425-430.
- Boskou, G., F.N. Salta, S. Chrysostomou, A. Mylona, A. Chiou and N.K. Andrikopoulos. 2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry* 94: 558-564.
- Chandewar, A. and H. Dhongade. 2013. Pharmacognostical and Phytochemical studies of *Phyllanthus amarus* leaves. *International Journal of Biomedical and Advance Research* 4(6): 382-389.
- Cieniak, C., B. Walshe-Roussel, R. Liu, A. Muhammad, A. Saleem, P.S. Haddad, A. Cuerrier, B.C. Foster and J.T. Arnason. 2015. Phytochemical comparison of the water and ethanol leaf extracts of the cree medicinal plant, *Sarracenia purpurea* L. (Sarraceniaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 18(4): 484-493.
- Conserva, L.M. and J.C. Ferreira. 2012. *Borreria* and *Spermacoce* species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. *Pharmacognosy Reveiws* 6(11): 46-55.
- Dehkharghanian, M., H. Adenier and M.A. Vijayalakshmi. 2010. Analytical methods study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass apectrometry. *Food Chemistry* 121: 863-870.
- Dhanani, T., S. Shah, N.A. Gajbhiya and S. Kumar. 2017. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry* 10: S1193-S1199.
- Djeridane, A., M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker and N. Vidal. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolics. *Food Chemistry* 97(4): 654-660.
- Fayaz, M., M.H. Bhat, A. Kumar and A.K. Jain. 2017. Comparative studies on different solvents used for the extraction of phytochemicals from the plant parts of *Arnebia benthamii* (Wall Ex. G. Don) Johnston. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 9(1): 220-224.
- Foo, L.Y. 1993. Amariin a di-dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* 33(2): 487-491.
- Foo, L.Y. and H. Wong. 1992. Phyllanthusiin D, an unusual hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* 31(2): 711-713.

- Ghasemzadeh, A., H.Z.E. Jaafar and A. Rahmat. 2010. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale roscoe*). *Molecules* 15: 4324-4333.
- Govindarajan, R., M. Vijayakumar, C.V. Rao, A. Shirwaikar, A.K.S. Rawat, S. Mehrotra and P. Pushpangadan. 2004. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27(8): 1266-1269.
- Hasler, C.M. and J.B. Blumberg. 1999. Symposium on phytochemicals: biochemistry and physiology. *Journal of Nutrition* 129: 756S-757S.
- Houghton, P.J., T.Z. Woldemariam, O.S. Siobhan and S.P. Thyagarajan. 1996. Two securiniga type alkaloids from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* 43(3): 715-717.
- Hsu, C.F., H. Peng, C. Basle, J. Trivas-Sejdic and P.A. Kilmartin. 2011. ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity of polypyrrole, polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Society of Chemical Industry* 60: 69-77.
- Joel, J.S., O.E. Sheena, O.E. Martins, N.S.C. Onyemauchekw and A.A. Emmanuel. 2017. Comparative antioxidant capacity of aqueous and ethanol fruit extract extracts of *Tetrapleura ttraptera*. *Journal of Biological Science* 17: 185-193.
- Kahkonen, M.P., A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala and M. Heinonen. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3954-3962.
- King, A. and G. Young. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 24: 213-218.
- Lau, K.M., Z.D. He, H. Dong, K.P. Fung and P.P.H. But. 2002. Anti-oxidative, anti-inflammatory and hepato-protective effects of *Ligustrum robustum*. *Journal of Ethnopharmacology* 83: 63-71.
- Liu, J., C. Wang, Z. Wang, C. Zhang, S. Lu and J. Liu. 2011. The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry* 126: 261-269.
- Liu, W., J. Liu, D. Yin and X. Zhao. 2015. Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. *PLOS ONE* 10(4): 1-22.
- Noiarsa, P., Q. Yu, K. Matsunami, H. Otsuka, S. Ruchirawat and T. Kanchanapoom. 2007. (Z)-3-Hexenyl diglycosides from *Spermacoce laevis* Roxb. *Journal of Natural Medicines* 61: 406-409.
- Patel, J.R., P. Tripathi, V. Sharma, N.S. Chauhan and V.K. Dixit. 2011. *Phyllanthus amarus* ethnomedicinal uses phytochemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology* 138(2): 286-313.
- Percival, M. 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights* 31: 1-4.
- Pokorny, J., N. Yanishlieva and M. Gordon. 2001. Antioxidant in Food: Practical Applications. Woodhead Publishing, Cambridge. 380 p.
- Radušienė, J., B. Karpaviciene and Z. Stanius. 2012. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in *St. John's wort*. *Botanica Lithuanica* 18(2): 101-108.

- Saxena, M., J. Saxena, R. Nema, D. Singh and A. Gupta. 2013. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(6): 168-182.
- Sharma, P., A.B. Jha, R.S. Dubey and M. Pessarakli. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, Article ID 217037, 26 p.
- Szakiel, C. Paczkowski and M. Henry. 2010. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reveiws* 10(4): 471-491.
- Usman, U.Z., A.B.A. Bakar and M. Mohamed. 2016. Phytochemical screening and comparison of antioxidant activity of water and ethanol extract propolis from Malasia. *Internationa; Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8(5): 419-415.
- Visht, S. and S. Chaturvedi. 2012. Isolation of natural product. *Current Pharma Research* 2(3): 584-599.
- Zalke, A.S., B. Duraiswamy, U.B. Gandagule and N. Singh. 2013. Pharmacognostical evaluation of *Cardiospermum halicacabum* Linn. leaf and stem. *Ancient Science of Life* 33(1): 15-21.
-