

ปริมาณไตรเทอร์ปีน สารประกอบฟีนอลิก
และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในบัวบก
Contents of Triterpenes, Phenolic Compounds,
and Antioxidant Capacity of *Centella asiatica* (L.) Urban

ลลิตา เจริญทรัพย์, เยาวพา จิระเกียรติกุล,

ภาณุมาศ ฤทธิไชย และพรชัย หาระโคตร*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Lalita Chareonsup, Yaowapha Jirakiattikul,

Panumart Rithichai, and Bhornchai Harakotr*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

บัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urban] เป็นพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรังบางชนิด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารไตรเทอร์ปีน สารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในบัวบก 6 ตัวอย่าง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าบัวบกแต่ละตัวอย่างมีปริมาณสารไตรเทอร์ปีน สารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยตัวอย่าง TU-CA 12 มีปริมาณมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดแคฟเฟอิกและความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] และ ABTS^{•+} สูงที่สุด ขณะที่ตัวอย่าง TU-CA 5 และ TU-CA 13 มีปริมาณกรดพาราความาริกและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและกรดแคฟเฟอิกมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าปริมาณไตรเทอร์ปีน ดังนั้นข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถนำมาใช้ในการพิจารณาเบื้องต้นสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงได้

คำสำคัญ : *Centella asiatica*; ไตรเทอร์ปีน; มาเดคาสโซไซด์; สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Abstract

Centella asiatica (L.) Urban is an important bioactive compound enriched medicinal herb, which have been shown to potentially prevent non-communicable diseases. Therefore, the objective of this study was to determine contents of triterpene, phenolic compound and antioxidant capacity of six accessions of *C. asiatica*. The experiment was conducted as a completely randomized design (CRD) with three replications. The results indicated that the contents of triterpene, phenolic compound and antioxidant capacity were significantly different ($p \leq 0.05$). TU-CA 12 contained the greatest contents of madecassoside, asiaticoside, caffeic acid, DPPH and ABTS radical scavenging capacities. The highest *p*-coumaric acid and total phenolic contents were found in TU-CA 5 and TU-CA 13, respectively. In addition, total phenolic content and caffeic acid were positively correlated with antioxidant capacity and exhibited their antioxidant capacities higher than triterpenes. Therefore, the results of this study should be used to select the accession of *C. asiatica* with high antioxidant contents and its antiradical capacities.

Keywords: *Centella asiatica*; triterpene; madecassoside; bioactive compound

1. บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชมากกว่าหนึ่งหมื่นชนิด ซึ่งจำนวนนี้เป็นสมุนไพรที่ใช้ในการผลิตยาแผนโบราณประมาณ 800-1,800 ชนิด แต่มีเพียง 300-500 ชนิด เท่านั้นที่มีการนำมาใช้ในการผลิตยารักษาโรคหรือใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้แก่ อาหารเสริม เครื่องดื่ม สบู่ ผลิตภัณฑ์ชุมชน เป็นต้น [1] บัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban เป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง คนไทยนิยมบริโภคกันมานานแล้วในรูปของผักสดหรือเป็นผักเครื่องเคียงกับอาหารประเภทต่าง ๆ นอกจากนี้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านสรรพคุณทางยา โดยรายงานทางวิทยาศาสตร์พบว่าสารสำคัญในบัวบก คือ สารในกลุ่มไตรเทอร์พีน (triterpene) ได้แก่ อะเซียติโคไซด์ (asiaticoside) มาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) กรดมาเดคาสสิก (madecassic acid) และกรดอะเซียติก (asiatic acid) ซึ่งมีฤทธิ์ด้านการอักเสบและบรรเทาอาการแพ้ [2] รักษาบาดแผล [3] มีฤทธิ์ในการป้องกัน

และรักษาโรคความจำเสื่อม ช่วยให้การเรียนรู้และความจำดีขึ้น [4] นอกจากนี้บัวบกยังพบสารสเตอรอล (sterol) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-hydroxybenzoic acid) กรดวานิลลิก (vanillic acid) กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) กรดแคฟเฟอิก (caffeic acid) กรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid) กรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) [5] ซึ่งมีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันโรคต่าง ๆ ได้แก่ ป้องกันโรคมะเร็ง โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน มีผลต่อการเปลี่ยนไขมันในร่างกายเป็นกล้ามเนื้อ เป็นต้น [6]

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจของสารสกัดบัวบกที่มีรายงานมาแล้ว ทำให้มีการใช้บัวบกเป็นส่วนประกอบในเภสัชภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ และเครื่องสำอางหลายประเภท ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ อย่างไรก็ตาม การผลิตวัตถุดิบสมุนไพรให้

ได้ทั้งผลผลิตและปริมาณสารสำคัญสูงขึ้นอยู่หลายปัจจัย เช่น เทคโนโลยีในการผลิตที่ถูกต้องและเหมาะสม การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการผลิต และที่สำคัญอย่างยิ่งคือ สายพันธุ์ที่ดี การศึกษาพบว่าสายพันธุ์ของบัวบกที่ต่างกันจะมีปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์พีน [7] สารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่างกันขึ้นอยู่กัแหล่งกำเนิดของบัวบก [8] นอกจากนี้ Somwong [9] รายงานว่าบัวบกที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายนมีปริมาณสารไกลโคไซด์ (glycoside) สูงที่สุด และมีปริมาณต่ำสุดเมื่อเก็บเกี่ยวบัวบกในเดือนกุมภาพันธ์ Fatema [10] รายงานว่าเมื่อเก็บเกี่ยวบัวบกในวันที่ 45 หลังปลูก มีผลผลิตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การเก็บเกี่ยวหลังปลูก 35, 55 และ 65 วัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาด้านการผลิตและคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกในประเทศไทยให้มีปริมาณสารสำคัญสูงยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์พีน สารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการอนุมูลอิสระในบัวบก เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกและวางแผนการเพาะปลูกเพื่อให้ได้ซึ่งปริมาณสารสำคัญและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การปลูกบัวบกและการเตรียมตัวอย่าง

รวบรวมต้นพันธุ์บัวบก จำนวน 13 ตัวอย่างจากแหล่งปลูกในประเทศไทย นำมาปลูกภายในโรงเรือนทดลองของสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอกองหลวง จังหวัดปทุมธานี จากนั้นคัดเลือกบัวบก 6 ตัวอย่าง ที่มีการเจริญเติบโตและผลผลิตสูง (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) มาใช้

เป็นต้นพันธุ์สำหรับการทดลอง โดยถอนต้นที่มีรากติดมาปลูกในกระบะปลูกที่มีดินผสมทางการค้า ระยะปลูก 15×15 ซม. ภายใตโรงเรือนพรางแสง 50 % ให้น้ำตามความเหมาะสม เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 45 วันหลังปลูก จากนั้นนำต้นมาล้างทำความสะอาด ใช้เฉพาะส่วนก้านใบและใบนำมาชั่งน้ำหนักสด จากนั้นหั่นน้ำหนักแห้ง ตามวิธีการของ Xiao และคณะ [11] นำตัวอย่างสดจุ่มไนโตรเจนเหลวและทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งก่อนนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

2.2 การสกัดตัวอย่าง

ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Jaiaree [12] โดยชั่งตัวอย่างแห้งที่บดแล้ว 1 กรัม นำมาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 % (อัตราส่วนของตัวอย่างแห้งและเอทานอล 1 : 3) สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน จากนั้นนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้มาระเหยในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ขึ้นไป จนกว่าสารสกัดตัวอย่างจะมีน้ำหนักคงที่ แล้วชั่งน้ำหนักและคำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัด (% extraction yield) จากสูตร ปริมาณสารสกัด (ร้อยละ) = (น้ำหนักสารสกัด ÷ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด) $\times 100$

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์พีน

วิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์พีนด้วย liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (LCMS-8030, Shimadzu) โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Hengjumrut และคณะ [13] คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร คือ InertSustain® C-18 HP (2.1×150 mm, $3\ \mu\text{m}$) อุณหภูมิ 35°C โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.2 % กรดฟอร์มิก (formic acid) ในน้ำ (สารละลาย A) และเมทานอล (สารละลาย B) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ 0-5 นาที, 20 % B; 5-

8 นาที, 90 % B และ 8-15 นาที, 20 % B อัตราการไหล 0.2 mL/min, ปริมาณการฉีด 2 μ L, MS/MS detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer สภาพของ mass spectrometer เป็นดังนี้ ชนิดของ ionization source ที่ใช้เป็น electrospray ionization (ESI) ชนิด negative mode ตั้งค่า ion source โดยใช้อุณหภูมิแก๊ส 350 °C อัตราการไหล

ของแก๊สที่ 15 L/min, Nebulizer ที่ความดัน 60 psi, อัตราการไหลของแก๊ส 3 L/min ไอออนที่ได้วิเคราะห์ด้วย multiple reaction mode (MRM) คำนวณปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟและวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (μ g/g DW)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิก

Table 1 List of *C. asiatica* (L.) Urban accessions, their origin and morphological traits.

Accession codes	Origins	Morphological traits
TU-CA 1	Khon Kaen	Big reniform leaf, long petiole, short stolon
TU-CA 4	Buriram	Small reniform leaf, very short petiole and stolon
TU-CA 5	Nakhon Pathom	Big reniform leaf, long and big petiole, long stolon
TU-CA 9	Kanchanaburi	Small reniform leaf, short petiole and stolon
TU-CA 12	Chumphon	Big reniform leaf, very short petiole, long stolon
TU-CA 13	Samut Prakan	Big reniform leaf, short petiole, long stolon



Figure 1 The accessions of *C. asiatica* (L.) Urban; (A) TU-CA 1, (B) TU-CA 4, (C) TU-CA 5, (D) TU-CA 9, (E) TU-CA 12, and (F) TU-CA 13

วิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิก(phenolic acid) ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (LCMS-8030, Shimadzu) ซึ่งดัดแปลงจาก Nowacka และคณะ [14] คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร คือ InertSustain® C-18 HP (2.1 × 150 mm, 3 µm) อุณหภูมิ 25 °C โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1 % กรดฟอร์มิก (สารละลาย A) และ 0.1 % กรดฟอร์มิกในเมทานอล (สารละลาย B) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ 0-1 นาที, 10 % B; 2-4 นาที, 20 % B; 8-9.5 นาที, 70 % B และ 11.5-15 นาที, 10 % B อัตราการไหล 0.2 mL/min, ปริมาตรการฉีด 2 µL สภาวะของ mass spectrometer ที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ ชนิดของ ionization source ที่ใช้ เป็น electrospray ionization (ESI) ทั้ง negative และ positive mode มีการตั้งค่า ion source โดยใช้อุณหภูมิแก๊ส 350 °C อัตราการไหลของแก๊สที่ 15 L/min Nebulizer ที่ความดัน 60 psi อัตราการไหลของแก๊สที่ 3 L/min ไอออนที่ได้วิเคราะห์ด้วย multiple Reaction mode (MRM) คำนวณปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟและวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (µg/g DW)

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Folin และ Ciocalteu [15] นำตัวอย่างสารสกัดบวกละลายด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้นปิเปตสารละลาย 20 µL ใส่ใน 96 well-microplate เติม 2 M Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า 100 µL เติมสารละลาย 7.5 % โซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) 80 µL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (infinite M200 PRO, Tecan) คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g DW)

2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH)

ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Brand และคณะ [16] นำสารสกัดบวกละลายด้วยตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL และนำไปโซนิเคท (sonicate) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปิเปตสารละลาย 20 µL ใส่ใน 96 well-microplate และเติมสารละลาย 0.06 mM DPPH 180 µL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้โทรลอคซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg TE/g DW)

2.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Azino-bis free radical scavenging activity (ABTS)

ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Re และคณะ [17] เตรียมสารละลาย ABTS โดยผสม 14 mM ABTS^{•+} 5 mL และ 4.9 mM โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K₂S₂O₈) 5 mL ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยน้ำกำจัดไอออน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.700±0.020 ละลายสารสกัดด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL และนำไปโซนิเคทเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปิเปตสารละลาย 20 µL ใส่ใน 96 well-microplate แล้วเติมสารละลาย ABTS 180 µL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูด

กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg TE/g DW)

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และปริมาณสารสกัด

บวบที่ปลูกทดสอบมีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และร้อยละของปริมาณสารสกัดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยตัวอย่าง TU-CA 1 มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด (2.75 ± 0.15 และ 0.37 ± 0.01 กรัม/ต้น ตามลำดับ) ขณะที่ตัวอย่าง TU-CA 13 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่ำสุด (1.48 ± 0.03 และ 0.16 ± 0.00 กรัม/ต้น ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้จากบวบทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่าง TU-CA 13 มี ร้อยละของปริมาณสารสกัดสูงสุด (ร้อยละ 23.57) เนื่องจากความแตกต่างกันของชนิดและปริมาณสารพิษเคมีที่มีอยู่ในบวบแต่ละตัวอย่าง เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวในการสกัด ทำให้สารพิษเคมีในตัวอย่างมีความสามารถในการละลายออกจากพืชต่างกัน [18] นอกจากนี้ Tambunan และคณะ [19] รายงานว่าสมุนไพรรักษาโรคมีชนิดและปริมาณของสารสกัดต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด พันธุ์ สภาพแวดล้อมในการปลูก อายุ และช่วงเวลาเก็บ

เกี่ยว ดังนั้นควรเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดเพื่อให้ได้ร้อยละของปริมาณสารสกัดสูงสุด

3.2 ปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปิน

การศึกษาปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปิน ได้แก่ มาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์ในบวบจำนวน 6 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิเคราะห์ไอออนด้วย multiple reaction mode (MRM) โดยตั้งค่าให้ตรวจสอบค่า m/z ที่ $973.4 \rightarrow 503.5$ สำหรับมาเดคาสโซไซด์ และ $957.4 \rightarrow 469.2$ สำหรับอะเซียติโคไซด์ (ตารางที่ 3) ผลการศึกษาพบว่ามาเดคาสโซไซด์เป็นสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปินหลักที่พบในบวบ มีค่า 2.34 ± 0.30 ถึง 101.10 ± 0.86 $\mu\text{g/g DW}$ ขณะที่อะเซียติโคไซด์มีค่า 0.44 ± 0.05 ถึง 20.79 ± 0.51 $\mu\text{g/g DW}$ (ตารางที่ 4) ซึ่งโดยทั่วไปจะพบมาเดคาสโซไซด์ในปริมาณที่มากกว่าอะเซียติโคไซด์ [9] สอดคล้องกับการศึกษาของ Prasad และคณะ [20] ที่รายงานว่าบวบ 2 สายพันธุ์ ซึ่งปลูกทดสอบในเมือง Bengaluru ประเทศอินเดีย มีปริมาณมาเดคาสโซไซด์สูงสุด 64.4 mg/g DW ขณะที่พบปริมาณอะเซียติโคไซด์สูงสุดเพียง 28.2 mg/g DW อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่าง TU-CA 12 ซึ่งเป็นบวบที่รวบรวมมาจากจังหวัดชุมพร มีปริมาณอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์สูงสุด (20.79 ± 0.51 และ 101.10 ± 0.86 $\mu\text{g/g DW}$ ตามลำดับ) ขณะที่ตัวอย่าง TU-CA 1 ซึ่งรวบรวมจากจังหวัดขอนแก่นมีปริมาณไตรเทอร์ปินทั้ง 2 ชนิดต่ำสุด (0.44 ± 0.05 และ 2.34 ± 0.30 $\mu\text{g/g DW}$ ตามลำดับ) (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Puttarak และ Panichayupakaranant [21] พบปริมาณอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์สูงในบวบสายพันธุ์ที่มีแหล่งรวบรวมมาจากภาคใต้ของประเทศไทย นอกจากนี้ปริมาณสารทั้ง 2 ชนิด ที่พบในตัวอย่าง TU-CA 12 สูงกว่าบวบที่ปลูกในประเทศอินเดียที่มี

ปริมาณอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์ 5.04 และ 26.88 $\mu\text{g/g}$ extract ตามลำดับ [22] ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของปริมาณสารทุติยภูมิเป็นผลมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือสายพันธุ์ที่ต่างกันของพืช ดังนั้นบัวบกตัวอย่าง TU-CA 12

มีปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์พีนสูง สามารถนำมาใช้เป็นต้นพันธุ์ในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรเชิงการค้า หรือสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกและวางแผนเพาะปลูกเพื่อให้ได้ซึ่งปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์พีนสูงที่สุด

Table 2 Fresh weight, dry weight and extract yield of six accessions of *C. asiatica* (L.) Urban

Accession codes	Fresh weight (g/plant)	Dry weight (g/plant)	Extraction yield (%)
TU-CA 1	2.75 $\pm$ 0.15 ^{a 1/}	0.37 $\pm$ 0.01 ^a	20.11 $\pm$ 0.48 ^c
TU-CA 4	1.33 $\pm$ 0.18 ^d	0.23 $\pm$ 0.03 ^{bc}	19.42 $\pm$ 0.24 ^c
TU-CA 5	2.23 $\pm$ 0.13 ^b	0.26 $\pm$ 0.02 ^b	19.77 $\pm$ 0.92 ^c
TU-CA 9	1.68 $\pm$ 0.17 ^c	0.21 $\pm$ 0.03 ^c	19.74 $\pm$ 0.44 ^c
TU-CA 12	2.10 $\pm$ 0.12 ^b	0.22 $\pm$ 0.18 ^c	21.59 $\pm$ 1.31 ^b
TU-CA 13	1.48 $\pm$ 0.03 ^{cd}	0.16 $\pm$ 0.00 ^d	23.57 $\pm$ 0.28 ^a
C.V. (%)	7.32	12.91	3.50

Values are expressed as mean $\pm$ SD; ^{1/} Different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

Table 3 Optimized MS/MS parameters for analyses of triterpenes and phenolic acids

Chemical names	Chemical formulas	Molecular weight	MS, m/z	MS/MS, m/z	Retention times (min)
Triterpenes					
Madecassoside	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	975.12	973.40	503.50	8.77
Asiaticoside	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₂	959.12	957.40	469.20	8.96
Phenolic acids					
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	137.05	93.00	10.05
Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	168.14	169.00	93.00	ND
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	179.15	135.10	10.34
<i>p</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.04	163.15	119.05	11.31
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	195.00	144.00	11.45

ND = not-detected

Table 4 Contents of triterpenes and phenolic acids by LC-MS/MS in six accessions of *C. asiatica* (L.) Urban

Accession codes	Triterpenes ($\mu\text{g/g DW}$)		Phenolic acids ($\mu\text{g/100 g DW}$)	
	Asiaticoside	Madecassoside	<i>p</i> -Coumaric acid	Caffeic acid
TU-CA 1	0.44 ± 0.05^e ^{1/}	2.34 ± 0.30^f	8.30 ± 0.64^e	2.37 ± 0.24^c
TU-CA 4	0.97 ± 0.70^e	7.70 ± 0.56^e	20.97 ± 0.45^b	2.18 ± 0.16^c
TU-CA 5	8.18 ± 0.34^d	20.27 ± 0.52^d	22.90 ± 0.38^a	ND
TU-CA 9	11.18 ± 1.03^b	39.87 ± 0.66^c	12.59 ± 0.11^c	4.80 ± 0.53^a
TU-CA 12	20.79 ± 0.51^a	101.10 ± 0.86^a	9.97 ± 0.13^d	5.02 ± 0.03^a
TU-CA 13	10.03 ± 0.26^c	48.19 ± 0.93^b	7.82 ± 0.15^e	3.07 ± 0.14^b
C.V. (%)	6.13	1.84	2.68	8.05

Values are expressed as mean $\pm$ SD; ND = not detected; ^{1/} Different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

3.3 ปริมาณกรดฟีนอลิก

การศึกษาค้นคว้าวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิก 5 ชนิด ที่มีรายงานว่าตรวจพบในบัวบก ได้แก่ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดวานิลลิก กรดแคฟเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์ูลิก [5,23] ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิเคราะห์ที่ไอออนด้วย multiple reaction mode (MRM) โดยตั้งค่าให้ตรวจสอบค่า m/z ที่ $137.05 \rightarrow 93.0$ สำหรับกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก $169.0 \rightarrow 93.0$ สำหรับกรดวานิลลิก $179.15 \rightarrow 135.10$ สำหรับกรดแคฟเฟอิก $163.15 \rightarrow 119.05$ สำหรับกรดพาราคูมาริก และ $195.0 \rightarrow 145.0$ สำหรับกรดเฟอร์ูลิก อย่างไรก็ตาม การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถตรวจพบกรดฟีนอลิกเพียง 2 ชนิด คือ กรดแคฟเฟอิกและกรดพาราคูมาริก ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) โดยตัวอย่าง TU-CA 5 มีปริมาณกรดพาราคูมาริกสูงที่สุด ($22.90 \pm 0.38 \mu\text{g/100 g DW}$) ขณะที่ตัวอย่าง TU-CA 12 มีปริมาณ

กรดแคฟเฟอิกสูงที่สุด ($5.02 \pm 0.03 \mu\text{g/100 g DW}$) (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ramesh และคณะ [24] ที่สามารถตรวจพบกรดแคฟเฟอิกและกรดพาราคูมาริกในสารสกัดบัวบก อย่างไรก็ตาม กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดวานิลลิก และกรดเฟอร์ูลิกไม่สามารถตรวจพบในตัวอย่างบัวบกที่ศึกษาเนื่องจากปริมาณกรดฟีนอลิกมีความเข้มข้นต่ำกว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) จึงระบุว่าสารดังกล่าวไม่มีอยู่ในตัวอย่าง [25] และจากหลายรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ระบุว่ากรดไฮดรอกซีซินนามิกเป็นกรดฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบทั่วไปในพืชที่มีฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง ด้านภาวะการอักเสบ และมีสมบัติในการช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกัน [26]

3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษากำหนดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในบัวบก 6 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างบัวบกมีปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 11.77 ± 1.30 ถึง 58.67 ± 1.00 mg GAE/g DW โดยตัวอย่าง TU-CA 13 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด นอกจากนี้บวบก็มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] และ ABTS^{•+} มีค่า 12.41 ± 0.45 ถึง 40.04 ± 1.53 และ 26.26 ± 0.56 ถึง 43.20 ± 0.02 mg TE/g DW ตามลำดับ โดยตัวอย่าง TU-CA 12 มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตัวอย่าง TU-CA 9 และ TU-CA 13 นอกจากนี้ตัวอย่าง TU-CA 12 มีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS^{•+} สูงที่สุด (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับ Dudonne และคณะ [27] ซึ่งรายงานว่าพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงตามไปด้วย เนื่องจาก สารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ดักจับอนุมูลอิสระได้ดี [28] ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในตัวอย่างบวบของการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าการทดลองของ Maulidiani และคณะ [29] และ Suzanna [30] ที่รายงานว่าสารสกัดจากบวบมี

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพียงแค่ 0.28 ถึง 0.72 mg GAE/g DW และ 0.02 ถึง 4.00 mg GAE/g DW ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของพืชที่ต่างกันนั้น เนื่องจากปริมาณและส่วนของพืชที่พบสารกลุ่มนี้มักจะต่างกันไปตามชนิด สายพันธุ์ และแหล่งปลูกของพืช [31] ดังนั้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนำมาใช้ในการพิจารณาเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์บวบที่มีปริมาณสารสำคัญสูงได้

3.5 ความสัมพันธ์ระหว่างไตรเทอร์ปิน สารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปิน สารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ในบวบ (ตารางที่ 6) พบว่าอะเซติโคไซด์และมาเดกาสโซไซด์มีความสัมพันธ์กันสูง ($r = 0.96$) เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิด นี้เป็นอนุพันธ์กลุ่มไตรเทอร์ปินเช่นเดียวกัน ซึ่งรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุว่า

Table 5 Total phenolic content and antioxidant capacities in six accessions of *C. asiatica* (L.) Urban

Accessions	TPC (mg GAE/g DW)	Antioxidant capacities (mg TE/g DW)	
		DPPH	ABTS
TU-CA 1	11.77 ± 1.30^d ^{1/}	17.73 ± 0.62^b	27.83 ± 0.67^c
TU-CA 4	22.25 ± 0.76^c	12.41 ± 0.45^c	27.68 ± 0.57^c
TU-CA 5	19.94 ± 1.50^c	12.95 ± 0.26^c	26.26 ± 0.56^c
TU-CA 9	42.98 ± 1.50^b	39.65 ± 1.07^a	40.17 ± 1.70^b
TU-CA 12	43.97 ± 1.46^b	40.04 ± 1.53^a	43.20 ± 0.02^a
TU-CA 13	58.67 ± 1.00^a	38.84 ± 0.02^a	41.42 ± 0.95^b
C.V. (%)	3.91	3.09	2.62

TPC = total phenolic content; DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity assay; ABTS = ABTS free radical scavenging activity assay; Values are expressed as mean $\pm$ SD; ^{1/} Different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

Table 6 Pearson's correlation coefficients among triterpene contents, phenolic compounds and antioxidant capacities of *C. asiatica* (L.) Urban.

Data	Madecassoside	<i>p</i> -Coumaric acid	Caffeic acid	TPC	DPPH	ABTS
Asiaticoside	0.96**	-0.28	0.87**	0.66**	0.76**	0.79**
Madecassoside		-0.40	0.80**	0.70**	0.78**	0.84**
<i>p</i> -Coumaric acid			-0.27	-0.48*	-0.69**	-0.64**
Caffeic acid				0.55*	0.83**	0.81**
TPC					0.88**	0.91**
DPPH						0.98**

TPC = total phenolic content; DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity assay; ABTS = ABTS free radical scavenging activity assay; *, ** = correlation is significant at $p < 0.05$ and 0.01 levels, respectively.

บัวบกมีปริมาณอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์ที่ใกล้เคียงกัน [32] การทดลองยังพบว่าอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์มีความสัมพันธ์สูงกับกรดแคฟแฟอิก ($r = 0.87$ และ 0.80 ตามลำดับ) สอดคล้องกับการศึกษาของ Günther และ Wagner [32] ที่รายงานว่าหากพบมาเดคาสโซไซด์ในปริมาณสูง จะพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์และกรดแคฟแฟอิกสูงด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] และ ABTS^{•+} มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณอะเซียติโคไซด์ ($r = 0.76$ และ 0.79 ตามลำดับ) และมาเดคาสโซไซด์ ($r = 0.78$ และ 0.84 ตามลำดับ) ในระดับกลาง ขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี ในระดับสูง ($r = 0.88$ และ 0.91 ตามลำดับ) และปริมาณกรดแคฟแฟอิก ($r = 0.83$ และ 0.81 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารไตรเทอร์พีน สอดคล้องกับศึกษาของ Niamnuy และคณะ [33] ที่รายงานว่าสารกลุ่ม

ไตรเทอร์พีนในบัวบกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารประกอบฟีนอลิก ดังนั้นสามารถนำข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมาใช้ในการพิจารณาเบื้องต้นสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] และ ABTS^{•+} สูง นอกจากนี้กรดพาราความีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี ($r = -0.48$, -0.69 และ -0.64 ตามลำดับ) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ต่างกัน ซึ่งกรดพาราควาในตัวอย่างบัวบกพบในปริมาณที่ต่ำมาก ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล DPPH[•] และ ABTS^{•+} ต่ำ จึงให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิด ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด [34] นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS^{•+} ($r = 0.91$) สูงกว่า DPPH[•] ($r = 0.88$) เนื่องจากอนุมูลของ DPPH[•] มีความคงตัวสูง ไม่ไวต่อการเข้าทำ

ปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนอนุมูลของ ABTS⁺ มีความคงตัวต่ำ ละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ จึงเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย อีกทั้งมีความว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าอนุมูล DPPH[•] [34] สอดคล้องกับการศึกษาของ Kundu และคณะ [35] ที่พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดบัวบก 5 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS⁺ ($r = 0.935$) และสูงกว่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] ($r = 0.898$)

4. สรุป

บัวบกตัวอย่าง TU-CA 12 มีปริมาณมาเดคาสโซไซด์ อะเซยติโคไซด์ กรดแคฟแฟอิก และความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] และ ABTS⁺ สูงที่สุด ขณะที่ตัวอย่าง TU-CA 5 มีปริมาณกรดพาราควมาริกสูงที่สุด นอกจากนี้ตัวอย่าง TU-CA 13 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ดังนั้นตัวอย่าง TU-CA 12 เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการส่งเสริมการผลิตเพื่อการค้า เนื่องจากให้ผลผลิตที่ดีและมีปริมาณสารสำคัญสูง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2561 ตามสัญญาเลขที่ 03/2560

6. References

- [1] Thai Trade Center Los Angeles, Thai herbal product champions presented at the Expo West, Anaheim, CA, Available Source: <https://www.thaitradeusa.com/home/?p=24552>, March 18, 2019.
- [2] Park, J.H., Choi, J.Y., Son, D.J., Park, E.K., Song, M.J., Hellström M. and Hong, J.T., 2017, Anti-inflammatory effect of titrated extract of *Centella asiatica* in phthalic anhydride- induced allergic dermatitis animal model, Int. J. Mol. Sci. 18: 1-14.
- [3] Somboonwong, J., Kankaisre, M., Tantisira, B. and Tantisira, M.H., 2012, Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: experimental animal study, BMC Complement Altern. Med. 12: 1-7.
- [4] Veerendra, K.M.H. and Gupta, Y.K., 2002, Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats, J. Ethnopharmacol. 79: 253-260.
- [5] Ramesh, B.N., Girish, T.K., Raghavendra, R.H., Akhilender Naidu, K., Akhilender Naidu, U.J.S. and Rao, K.S., 2014, Comparative study on anti-oxidant and anti-inflammatory activities of *Caesalpinia crista* and *Centella asiatica* leaf extracts, J. Pharm. Bioallied Sci. 6: 86-91.
- [6] Tomas-Barberan, F.A. and Espin, J.C., 2001, Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables, J. Sci. Food Agric. 81: 853-876.
- [7] Randriamampionona, D., Diallo, B., Rakotoniriana, F., Rabemanantsoa, C., Cheuk, K., Corbisier, A.M., Mahillon, J.,

- Ratsimamanga, S. and El Jaziri, M., 2007, Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: application for *ex situ* conservation and clonal propagation, *Fitoterapia* 78: 482-489.
- [8] Alqahtani, A., Cho, J.L., Wong, K.H., Li, K., Razmovski-Naumovski, V. and Li, G.Q., 2017, Differentiation of three *Centella* species in Australia as inferred from morphological characteristics, ISSR molecular fingerprinting and phytochemical composition, *Front. Plant Sci.* 8: 1-16.
- [9] Somwong, P., 2006, Isolation, Purification and Quantitative Determination of Asiaticoside, Madecassoside, Asiatic Acid and Madecassic Acid in Varieties of *Centella Asiatica* (L.) URB., Master Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, 130 p.
- [10] Fatema, S.U., 2006, Effect of Fertilizers, Planting Time and Harvesting Period on the Yield of Thankuni (*Centella asiatica*) under 80 % Photosynthetically Active Radiation, Master Thesis, Bangladesh Agricultural University, Bangladesh, 49 p.
- [11] Xiao, Z., Lester, G.E., Luo, Y. and Wang, Q., 2012, Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: edible microgreens, *J. Agric. Food Chem.* 60: 7644-7651.
- [12] Jaiarree, N., 2010, Biological Activities of *Dioscorea birmanica* Prain and Burkill Extract and Its Active Ingredients, Doctoral Dissertation, Thammasat University, Pathum Thani, 130 p.
- [13] Hengjumrut, P., Anukunwithaya, T., Tantisira, M.H., Tantisira, B. and Khemawoot, P., 2017, Comparative pharmacokinetics between adecassoside and asiaticoside presented in a standardised extract of *Centella asiatica*, ECa 233 and their respective pure compound given separately in rats, *Xenobiotica*, Early Online 2017: 1-10.
- [14] Oniszczuk, A. and Olech, M., 2016, Optimization of ultrasound- assisted extraction and LC-ESI-MS/MS analysis of phenolic acids from *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*, *Ind. Crop Prod.* 83: 359-363.
- [15] Folin, O., and Ciocalteu, V., 1927. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *J. Biol. Chem.* 73: 627-650.
- [16] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebenson Wiss Technol.* 28: 25-30.
- [17] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- [18] Upadhyay, V., Pai, S.R., Sharma, A.K., Hegde, H.V., Kholkute, S.D. and Joshi, R.K., 2014, Compound specific extraction of

- camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* and piperine from *Piper nigrum* using accelerated solvent extractor, J. Anal. Methods Chem. 2014: 1-7.
- [19] Tambunan, A.P., Bahtiar, A. and Tjandrawinata, R.R., 2017, Influence of extraction parameters on the yield, phytochemical, TLC- densitometric quantification of quercetin, and LC- MS profile, and how to standardize different batches for long term from *Ageratum conyzoides* L. leaves, Pharmacogn. J. 9: 767-774.
- [20] Prasad, A., Yadav, K.S., Yadav, N.P., Mathur, A., Sreedhar, R.V., Lal, R.K. and Mathur, A.K., 2016, Biomass and centellosides production in two elite *Centella asiatica* germplasms from India in response to seasonal variation, Ind. Crops Prod. 94: 711-720.
- [21] Puttarak, P. and Panichayupakaranant, P., 2012, Factors affecting the content of pentacyclic triterpenes in *Centella asiatica* raw materials, Pharm. Biol. 50: 1508-1512.
- [22] Srivastava, S., Verma, S., Gupta, A., Rajan, S. and Rawat, A.K.S., 2014, Studies on chemotypic variation in *Centella asiatica* (L.) Urban from nilgiri range of India, JPC J. Planar Chromat. 27: 454-459.
- [23] Orhan, I.E., 2012, *Centella asiatica* (L.) Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2012: 1-8.
- [24] Ramesh, B.N., Girish, T.K., Raghavendra, R.H., Naidu, K.A., Prasada Rao, U.J.S. and Rao, K.S., 2014, Comparative study on anti- oxidant and anti- inflammatory activities of *Caesalpinia crista* and *Centella asiatica* leaf extracts, J. Pharm. Bioallied Sci. 6: 86-91.
- [25] Khojah, E.Y., 2010, Development of a GC- MS Method and Analysis of Phenolic Acids in Fruit and Spice Matrices and Evaluation of their Antioxidant Capacity, Doctoral Dissertation, The University of New South Wales, Sydney, 230 p.
- [26] Ferguson, L.R., Shuo-tun, Z. and Harris, P.J., 2005, Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells, Mol. Nutr. Food Res. 49: 585-93.
- [27] Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. and Merillon, J.M., 2009, Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays, J. Agric. Food Chem. 57: 1768-1774.
- [28] Lopes, G.B., Schulman, H.M. and Lima, M.H., 1999, Polyphenol tannic acid inhibition hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions, Biochim. Biophys. Acta 1426: 475-482.

- [29] Maulidiani, F., Khatib, A., Shaari, K. and Lajis, N.H., 2014, Chemical characterization and antioxidant activity of three medicinal *Apiaceae* species, Ind. Crops Prod. 55: 238-247.
- [30] Suzanna, E., 2014, Analysis of Phenolics from *Centella asiatica* and *Vernonia amygdalina* and their Role as Antibacterial and Antioxidant Compounds, Master Thesis, University of Malaya, Kuala Lumpur, 248 p.
- [31] Duh, P.D. and Yen, G.C., 1997, Antioxidant activity of three herbal water extracts, Food Chem. 60: 639-645.
- [32] Günther, B. and Wagner, H., 1996, Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) Urban, Phytomedicine 3: 59-65.
- [33] Niamnuy, C., Charoenchaitrakool, M., Mayachiew, P. and Devahastin, S., 2013, Bioactive compounds and bioactivities of *Centella asiatica* (L.) Urban prepared by different drying methods and conditions, Dry Technol. 31: 2007-2015.
- [34] Oliveira, S.D., Souza, G.A.D., Eckert, C.R., Silva, T.A., Sobral, E.S., Fávero, O.A., Ferreirall, M.J.P., Romoffl, P. and Baaderl, W.J., 2014, Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts, Quim. Nova 37: 497-503.
- [35] Kundu, S., Haque, S.M. and Ghosh, B., 2015, Comparative analysis of bioactive compounds in different habitat of *Centella asiatica* (L.) Urban: Application for *in vitro* clonal propagation of elite ecotype, J. Appl. Pharm. Sci. 5: 30-36.