การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 80% เอทานอลจากหญ้าตีนตุ๊กแก

A Study on Anti-Free Radical of 80% Ethanolic Extract from *Tridax procumbens* Linn.

อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล[1]และฑิฆัมพร พันหุ่น[1]

Arunrat Sunthitikawinsakul[1]and Thikamporn Phanhun[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 80% เอทานอลของหญ้าตีนตุ๊กแกจากส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ดอก ใบ ลำต้น และรากดังนี้ การตรวจสอบประเภทฟลาโวนอยด์เบื้องต้น ปรากฏว่าพบฟลาโวนเฉพาะในส่วนดอกและลำต้น และแคทีชินพบในทุกส่วน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นโดยการฉีดพ่นน้ำยาดีพีพีเอช (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) ลงบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี (TLC) ผลพบว่า เกิดการฟอกจางสีม่วงของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดทุกส่วนของหญ้าตีนตุ๊กแก เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดส่วนดอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ส่วนใบ ราก และลำต้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด กล่าวคือ ค่า IC_{50} เท่ากับ 290, 320 และ 1,480 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เทียบกับสารมาตรฐาน BHA (3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ABSTRACT

An 80% ethanolic extract from various parts, flowers, leaves, stems and roots, of *Tridax procumbens* Linn. was evaluated as an anti-free radial. As the phytochemical screening of flavonoids, the flavones were found only in the flowers and stems of *T. procumbens* and the catechins were obtained in all parts. The anti-free radical activity was tested with a rapid thin-layer chromatography (TLC) screening method by spraying with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reagent. Consequently, all extracts showed an off purple-colored spot as the anti-free radical constituents that were further determined by the DPPH assay. Resultantly, the flower of *T. procumbens* showed highly the free radical scavenging activity with IC_{50} value of 70 mg/L more than the leaves, roots and stems, whose IC_{50} values were 290, 320 and 1,480 mg/L, respectively, by comparison with BHA (IC_{50} value of 8.5 mg/L) as a standard compound.

Key Words: *Tridax procumbens* Linn, flavonoid, antioxidant, DPPH assay, anti-free radical

E-mail address: arunrat28@npru.ac.th

---

[1]โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม จังวัดนครปฐม 73000

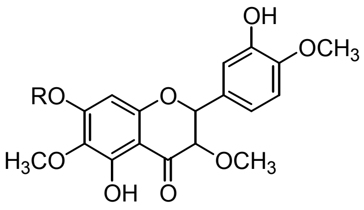
Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, Nakhon Pathom, 73000

คำนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว ($A^{\bullet}$) อยู่ออร์บิทัลวงนอกสุด คุณสมบัติมีความว่องไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในการก่อให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด โรคข้ออักเสบ และโรคมะเร็ง เป็นต้น (อัญชณา, 2554) ถ้าอนุมูลอิสระจับกับโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-free radical) เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และวิตามินซี เป็นต้น (โอภา, 2549) จะทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แล้วเปลี่ยนเป็นสารที่เสถียรขึ้น ทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคดังกล่าวได้

หญ้าตีนตุ๊กแก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tridax procumbens* Linn. อยู่ในวงศ์ COMPOSITAE (หรือ ATERACEAE) เป็นพืชล้มลุก พบได้ทั่วไปในหลายประเทศแถบเขตร้อน ซึ่งได้นำหญ้าตีนตุ๊กแกมาเป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคกระเพาะ แก้หวัด ปวดท้อง โรคท้องร่วง โรคบิด เป็นต้น (Taddei *et al*., 2000) สำหรับในประเทศไทย ใช้ส่วนใบมาตำแล้วพอกบริเวณส่วนของร่างกาย เพื่อบรรเทาอาการปวด แก้อักเสบและรักษาโรคฝี เป็นต้น (ดวงพร, 2544) การรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสกัดเอธิลอะซีเตตของหญ้าตีนตุ๊กแก (ทุกส่วน) และสารสกัดเมทานอลของใบออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Jachak *et al*., 2011; Krishani *et al*., 2010) สารสกัดเฮกเซนของดอกและทั้งต้นหญ้าตีนตุ๊กแกสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* group C, *Salmonella paratyphi*, และ *Smegmatis* (Taddei *et al*., 2000) ป้องกันไวรัสตับอักเสบในหนู (Ravikumar *et al*., 2005) กระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Tiwari *et al*., 2004)

สำหรับองค์ประกอบทางเคมีพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ทั้งในรูปอิสระและไกลโคไซด์ เช่น สาร centaureidin (**1**) และสาร centaurein (**2**) (Figure 1) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในกระบวนการอักเสบ (Jachak *et al*., 2011) สาร 3,6-dimethoxy-5,7,2′,3′,4′-pentahydroxyflavone-7-*O*-*β*-D-gluco-pyranoside (Ali *et al*., 2001) และสาร (3S)-16,17-didehydrofalcarinol ออกฤทธิ์ยับยั้งสาเหตุของโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิตโปรโตซัว (Leishmania) (Martin-Quintal *et al*., 2009) นอกจากนั้นยังพบสารอื่น ได้แก่ แอลคิลเอสเทอร์ สเตอร์รอล ไทรเทอร์พีน ลิกนิน กรดไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น (Ali *et al*., 2002; Raju and Davidson, 1994)



1, R = H
2, R = β-D-glucopyrasyl

Figure 1 Structure of centaureidin (**1**) and centaurein (**2**)

ด้วยเหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 80% เอทานอลของหญ้าตีนตุ๊กแกส่วนต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านการแพทย์หรือเป็นแพทย์ทางเลือก นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ตลอดจนช่วยเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

เครื่องมือและสารเคมี

- เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ยี่ห้อ Shimadzu UV-VIS 1601) และวัดด้วยควอตซ์เซลล์
- แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทรากราฟีแบบอะลูมิเนียม ชนิดซิลิกาเจล 60 F_{254}
- สารเคมี ได้แก่ 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) บริษัท Sigma-Aldrich และ 1,1–diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Sigma-Aldrich

การเตรียมสารสกัดจากพืช

เก็บส่วนดอก ใบ ลำต้นและรากของหญ้าตีนตุ๊กแก (จาก อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี พ.ศ. 2555) มาล้างน้ำให้สะอาด แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปตากให้แห้งในที่อากาศถ่ายเทสะดวก จากนั้นนำแต่ละส่วนที่แห้งแล้ว (น้ำหนักของส่วนดอก ใบ ลำต้น และราก เท่ากับ 2.1099, 2.0720, 4.1266 และ 2.0935 กรัม ตามลำดับ) มาสกัดต่อเนื่องด้วยเครื่องซอกห์เลต (Soxhlet extractor) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (เพื่อกำจัดไขมันในพืชออก) และ 80% เอทานอล ตามลำดับ จนกระทั่งสารถูกสกัดออกมาหมด หลังจากนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน จะได้สารสกัดหยาบ 80% เอทานอลของส่วนดอก ใบ ลำต้น และรากเท่ากับ 0.3154 (14.95%), 0.4403 (21.25%), 15.7199 (15.72%) และ 9.6919 กรัม (9.69%) ตามลำดับ

การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นหาประเภทฟลาโวนอยด์

การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นหาประเภทฟลาโวนอยด์ (รัตนา, 2550) ดังนี้

- *ฟลาโวนอยด์ประเภทฟลาโวน ฟลาโวนอล และฟลาวาโนน*

ทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาไซยานิดิน (cyanidin reaction) โดยใส่แผ่นแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ 3-4 แผ่น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 หยด ลงในสารสกัดพืช 1 มิลลิลิตร สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใน 2-3 นาที โดยเปรียบเทียบกับสีของสารสกัดเดิม ถ้าสีที่เกิดขึ้นเป็นสีส้มถึงแดงแสดงว่ามีฟลาโวน ถ้าได้สีแดงถึงสีแดงเข้มหรือแดงเลือดหมูแสดงว่ามีฟลาโวนอล ถ้าได้สีแดงเข้มถึงแดงอมม่วงแสดงว่ามีฟลาวาโนน

- *ฟลาโวนอยด์ประเภทชาลโคนและออโรน*

ทดสอบโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 หยด ลงในสารสกัดพืชปริมาตร 1 มิลลิลิตร สังเกตสีที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับสีของสารสกัดเดิม ถ้าได้สีแดงเกิดขึ้นทันทีแสดงว่ามีชาลโคนและออโรน

- *ฟลาโวนอยด์ประเภทแอนโธไซยานิดิน*

ทดสอบโดยต้มกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1% จำนวน 10 หยด ลงในสารสกัดพืช 1 มิลลิลิตร สังเกตสีที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับสีของสารสกัดเดิม ถ้าเกิดสีอมส้มถึงแดงอมน้ำเงินแสดงว่าแอนโธไซยานิดิน

- *ฟลาโวนอยด์ประเภทลิวโคแอนโธไซยานิดิน*

ทดสอบโดยต้มกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 หยด และ 1-โพรพานอล 10 หยด ลงในสกัดพืช 1 มิลลิลิตร นาน 15-30 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับสีของสารสกัดเดิม ถ้าสารละลายเป็นสีแดงหรือสีม่วงแสดงว่ามีลิวแอนโธไซยานิดิน

- *ฟลาโวนอยด์ประเภทแคทีชิน*

ทดสอบโดยหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1% จำนวน 1-2 หยด ลงใน สารสกัดพืช 1 มิลลิลิตร สังเกตสีที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับสีของสารสกัดเดิม ถ้าได้สีน้ำเงินหรือเขียวเกิดขึ้นแสดงว่ามีแคทีชิน

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฉีดพ่นน้ำยาดีพีพีเอช (DPPH reagent) **บนแผ่น** TLC

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฉีดพ่นน้ำยาดีพีพีเอช (รัตนา, 2550) ดังนี้

จุดสารสกัดส่วนดอก ใบ ลำต้นหรือรากบนแผ่น TLC จากนั้นจุ่มแผ่น TLC ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่เหมาะสมของคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : กรดฟอร์มิก ในขวดที่มีฝาปิด อัตราส่วน 4:0.8:0.2, 4.6:0.2:0.2, 4:0.8:0.2 และ 4:0.8:0.2 ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นโครมาโทแกรมไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งจุดสารที่ปรากฏด้วยดินสอ แล้วทำการฉีดพ่นน้ำยา DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ ให้ทั่วแผ่น TLC ถ้าในสารสกัดมีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ จะเกิดจุดสีม่วงฟอกจาง

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging assay

การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (สาวิตรี, 2552; Hatano *et al*, 1988) ดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHA ในเอทานอล ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปิเปตแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BHA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดตัวอย่างสีชา เติมสารละลาย DPPH ในเอทานอลความเข้มข้น 0.634 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A_{sample}) ที่ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) 519 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (3 ซ้ำ) โดยใช้เอทานอลเป็นสารละลายแบงค์ (Blank Solution)

ทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐาน BHA เป็นสารสกัด 80% เอทานอลส่วนต่าง ๆ ของหญ้าตีนตุ๊กแก

จากนั้นหาค่าเฉลี่ย A เพื่อนำมาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%radical scavenging) ดังนี้

$$\%radical\ scavenging = [\ (A_{control} - A_{sample})\ /\ A_{control}\ ]\ x\ 100$$

เมื่อ A_{sample} = *ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง*

$A_{control}$ = *ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH 0.634 มิลลิโมลาร์*

แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %radical scavenging กับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH มีปริมาณลดลงเหลือ 50%)

ผลและวิจารณ์

การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นของฟลาโวนอยด์ 7 ประเภท ได้แก่ ฟลาโวน ฟลาโวนอล แอนโธไซยานิดิน ฟลาวาโนน ชาลโคน ออโรน ลิวโคแอนโธไซยานิดิน และแคทีชิน ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี (color reaction test) ของสารสกัด 80% เอทานอลส่วนต่าง ๆ ของหญ้าตีนตุ๊กแก ปรากฏว่า พบฟลาโวนเฉพาะในส่วนลำต้นและรากเท่านั้น และแคทีชินพบในทุกส่วน (Table 1)

Table 1 Phytochemical screening of flavonoids from the *T. procumbens* 80% ethanolic extract

Parts of plant	Color of extract	Color reaction tests of flavonoids				
		Flavones	Chalcones, Aurones	Anthocyanidins	Leucoantho-cyanidins	Catechins
flowers	a yellow	+ve	-ve	-ve	-ve	+ve
leaves	a yellow	-ve	-ve	-ve	-ve	+ve
stems	a yellow	+ve	-ve	-ve	-ve	+ve
roots	a light yellow	-ve	-ve	-ve	-ve	+ve

+ve as a positive test; -ve as a negative test

ส่วนการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสี่ส่วน โดยการฉีดพ่นน้ำยา DPPH บนแผ่น TLC และใช้คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : กรดฟอร์มิกเป็นระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ พบว่าทั้งส่วนดอก ใบ ลำต้นและราก ของหญ้าตีนตุ๊กแกเกิดการฟองจางสีม่วงของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า R_f อยู่ในช่วง 0-0.65, 0-0.25, 0-0.76 และ 0-0.76 ตามลำดับ แสดงว่าทุกส่วนของสารสกัดหญ้าตีนตุ๊กแกออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งผลสอดคล้องกับการทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์เบื้องต้น โดยฟลาโวนอยด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เกาะอยู่บนวงอะโรมาติก ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาจะให้อิเล็กตรอน 1 ตัว ($H^•$) แก่อนุมูลอิสระ ($DPPH^•$) แล้วเปลี่ยนเป็น $Ar\text{-}O^•$ ที่เสถียรและไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา เนื่องจากผลของเรโซแนนซ์ (resonance effect) และ DPPH ทำให้เกิดการฟอกจางสีม่วง (Figure 2) ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสี่ส่วนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 70 ± 0.95, 290 ± 0.48, 1,480 ± 0.80 และ 320 ± 0.53 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เทียบกับสารมาตรฐาน BHA ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.5 ± 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 2)

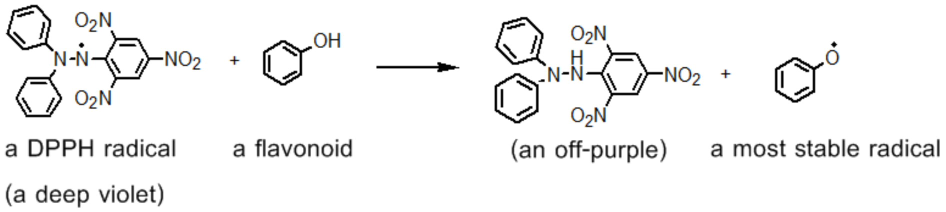


Figure 2 Reaction between DPPH radical ($DPPH^•$) and a flavonoid ($Ar\text{-}O^•$) as the anti-free radical Scavenging

Table 2 DPPH radical scavenging activity (IC_{50}) of the *T. procumbens* 80% ethanolic extract

Part of plant	IC_{50} (mg/L)[a]
flowers	70 ± 0.95[b]
leaves	290 ± 0.48[b]
stems	1480 ± 0.80[b]
roots	320 ± 0.53[b]
BHA	8.5 ± 1.50[b]

[a]The IC_{50} was defined as the concentration of the sample that causes 50% loss of DPPH activity.

[b]Data were expressed as mean ± SD. for 3 replications.

สรุป

สารสกัด 80% เอทานอลของส่วนดอก ใบ ลำต้น และรากออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องจากพบสารฟลาโวนอยด์ประเภทแคทีชินและฟลาโวน และสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทางเคมี โดยส่วนดอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ รากและลำต้น ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยจะได้ทำการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content assay) และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content assay) ในส่วนต่าง ๆ ต่อไป เนื่องจากมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกับฟลาโวนอยด์ รวมทั้งการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์ เพื่อหาสารออกฤทธิ์ดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำหญ้าตีนตุ๊กแกใช้เป็นยาบรรเทาการอักเสบและโรคที่มีสาเหตุจากสารอนุมูลอิสระต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งสำเร็จได้โดยทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ปี 2555

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร สุวรรณกุล และ รังสิต สุวรรณเขตนิยม. 2544. **วัชพืชในประเทศไทย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2550. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. (พิมพ์ครั้งที่ 2). แอคทีฟ พริ้นท์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี งามโสภา. 2552. **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลจากเหง้าขมิ้นชัน**. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

อัญชณา เจนวิถี. 2554 **การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย.** ปริญญาวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โอภา วัชระคุปต์. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ.** พี.เอส.พริ้นท์, กรุงเทพฯ.

Ali, M., E. Ravinder and R. Ramachandram. 2001. A new flavonoid from the aerial parts of *Tridax procumbens*. **Fitoterapia** 72: 313-315.

Ali, M. S, M. Jahangir, S. S. Hussan and M. I. Choudhary. 2002. Inhibition of α-glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. **Phytochemistry** 60: 295-299.

Hatano, T., H. Kasawa, T. Yashuhara and T. Okuta. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice roots: their relative astringency and radical scavenging effects. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** 36: 1090-2097.

Jachak, S. M., R. Gautam, C. Selvam, H . Madhan, A. Srivastava and T. Khan. 2011. Anti-inflammatory cyclooxygenase inhibitory and antioxidant activities of standardized extracts of *Tridax procumbens* L. **Fitoterapia** 82: 173-177.

Krishani, P. M., X. Ratlinam, K. Marimuthua, A. Diwakar, S. Ramanathan, S. Kathiresan and S. Subamaniam. 2010. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic leaf extracts of *Ficus religiosa* L, *Chromolaena odorata* (L.) King & Rabinson, *Synodal dactylon* (L.) Pers. and *Tridax procumbens* L. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 3: 348-350.

Martin-Quintal, Z., R. Moo-Puc, F. Gonzalez-Salazar, M. J. Chan-Bacab, L. W. Torres-Tapia and S. R. Peraza-Sanchez. 2009. In vitro activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania Mexicana*. Journal of Ethnopharmacology 122: 463-467.

Raju, T. S and E. A. Davidson. 1994. Structural features of water-soluble novel polysaccharide components from the leaves of *Tridax procumbens* Linn. Carbohydrate Research 258: 243-254.

Ravikumar, V., K. S. Shivashangari and T. Devaki. 2005. Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens* against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatitis in rats. Journal of Ethnopharmacology 101: 55-60.

Taddei A. and A. J. Rosas-Romero. 2000. Bioactivity studies of extracts from *Tridax procumbens*. Phytomedicine 7: 235-238.

Tiwari, U., B. Rastogi , P. Singh, D. K. Saraf and S. P. Vyas. 2004. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology 92: 113–119.