

HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG VIÊM IN VITRO CỦA CÁC CAO CHIẾT LÁ CÂY CÒ SEN (*Milium velutinum*)

Đến tòa soạn 03-10-2019

Đái Thị Xuân Trang, Trần Chí Linh, Nguyễn Trọng Tuấn
Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

SUMMARY

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF MILIUM VELUTINUM LEAVES EXTRACTS

Milium velutinum leaf contains a promising source of bioactive compounds since it has been traditionally used for the treatment of various diseases. The present study aimed at evaluating the effect of different solvents on phytochemical constituents, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Milium velutinum* leaves extracts. Aqueous solvent was identified as the most effective one for the extraction, resulting as the highest content of polyphenol (13.85 ± 0.13 mg GAE/g extract) and flavonoid (267.34 ± 4.93 mg QE/g extract). In addition, the study was conducted to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Milium velutinum* leaves extracts. The antioxidant activity was determined using nitric oxide radical inhibition assay. In vitro anti-inflammatory activity was evaluated using albumin denaturation method. The results showed that the aqueous extract exhibited high capacity of antioxidant (EC_{50} value of 157.08 ± 2.90 μ g/mL) and in vitro anti-inflammatory activity (i.e., albumin denaturation: $IC_{50} = 21.13 \pm 0.95$ μ g/mL). The antioxidant activity of the aqueous extract was found to be 4.63-fold higher than vitamin C, and the anti-inflammatory activity of *Milium velutinum* extracts was comparable to diclofenac and prednisolone. Based on the obtained results, it can be concluded that *Milium velutinum* leaves extracts displayed anti-inflammatory and antioxidant activity.

Keywords: Anti-inflammatory, antioxidant, diclofenac, *Milium velutinum*, nitric oxide, prednisolone.

1. MỞ ĐẦU

Viêm là sản phẩm bình thường của phản ứng bảo vệ vật chủ đối với tổn thương mô do nhiều kích thích như chấn thương vật lý, hóa chất và tác nhân truyền nhiễm [1, 2]. Hơn nữa, rối loạn chức năng viêm dẫn đến các bệnh mãn tính đang góp phần làm tăng chi phí chăm sóc sức khỏe cho xã hội [3]. Các thuốc chống viêm không steroid (NSAID), steroid và thuốc ức chế miễn dịch đã được sử dụng để xử lý các dạng viêm nhiễm [4]. Tuy nhiên, những loại thuốc này lại gây ra nhiều tác dụng phụ như viêm mạch máu, nhức đầu, thiếu máu tán huyết và các vấn đề liên quan đến suy giảm miễn dịch [5, 6]. Stress oxy hóa là một trong những nhân tố hàng đầu gây viêm, dẫn đến sự hình thành

các hợp chất độc hại tiềm ẩn [7, 8]. Các chất kháng oxy hóa tự nhiên trong thực vật là những chất kháng viêm tiềm năng và đang thu hút sự chú ý trong những năm gần đây [9, 10, 11].

Cây Cò Sen (*Milium velutinum*) là một loài thực vật thuộc chi *Milium* được sử dụng nhiều trong y học dân gian như một loại thuốc bổ, thuốc kích thích tinh dục, trị ghẻ lở, bệnh ngoài da, hắc lào, mụn nhọt, đau dạ dày và rất có hiệu quả trong việc điều trị các bệnh liên quan đến viêm [12, 13]. Tuy nhiên, những công dụng này chỉ là những công dụng lưu truyền trong dân gian chưa được chứng minh, đặc biệt là hoạt tính kháng viêm của cây Cò Sen. Vì vậy, việc xác

định một số hoạt tính kháng viêm, kháng oxy hóa của lá cây Cò Sen rất cần thiết cho sự thay thuốc tổng hợp điều trị bệnh do viêm, giúp cân bằng hệ thống chất kháng oxy hóa và những vấn đề do viêm gây ra trong cơ thể.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Phương tiện, thiết bị và vật liệu thí nghiệm

Vật liệu: Lá cây Cò Sen được thu tại núi Cẩm, tỉnh An Giang. Thực vật (mã số: AG_Mi201906040005) được định danh bởi thạc sĩ Phùng Thị Hằng, Bộ môn Sư phạm Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ và hiện đang được lưu giữ tại PTN Sinh học thực vật, Bộ môn Sinh học, Khoa KHTN, Trường Đại học Cần Thơ.

Thiết bị được sử dụng gồm: máy ly tâm (Mikro 12-24, Hettich, Đức), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Japan), máy cô quay chân không (Heidolph, Đức) và một số thiết bị khác.

Hóa chất: ethanol (Mecrk), n-hexane (Mecrk), ethyl acetate (Mecrk), vitamin C (Sigma-Aldrich), albumin huyết thanh bò (Himedia), Diclofenac (Sigma-Aldrich), Prednisolon (Sigma-Aldrich), acetic acid (Merck), Sodium nitroprusside dehydrate (Spain).

2.2. Điều chế cao chiết lá cây Cò Sen

Lá cây Cò Sen sau khi thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm trong ethanol. Mẫu được ngâm 3 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô đuổi dung môi thu được cao ethanol tổng. Cao ethanol được chiết lỏng-lỏng với các dung môi n-hexane, dichloromethane và ethyl acetate thu được các cao chiết tương ứng. Đồng thời, phần dịch nước còn lại cũng được cô quay để loại bỏ nước thu được cao nước [14].

2.3. Định tính thành phần hóa học các cao chiết

Nhóm hợp chất như alkaloid, flavonoid, glycoside, tanin, triterpenoid, saponin được định tính sơ bộ bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên [14].

2.4. Định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong các cao chiết

Hàm lượng polyphenol được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu theo mô tả của Rebaya *et al.* [15]. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các cao chiết được xác định theo phương pháp so màu $AlCl_3$ của Bag *et al.* [16].

2.5. Khảo sát hoạt động kháng oxy hóa của các cao chiết lá cây Cò Sen

Khả năng trung hòa gốc tự do nitric oxide (NO^*) của các cao chiết được khảo sát theo phương pháp Alisi & Onyeze [17] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 200 μL cao chiết và 400 μL sodium nitroprusside (5 M). Hỗn hợp phản ứng được ủ 60 phút ở 25°C, rồi ly tâm 11000 vòng/ phút trong 15 phút. Dịch ly tâm được bổ sung 600 μL thuốc thử Griess. Sau đó mẫu được ủ tiếp 5 phút và tiến hành xác định độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 546 nm. Vitamin C được sử dụng như chất đối chứng dương.

2.6. Khảo sát hoạt tính kháng viêm in vitro

Khả năng kháng viêm của các cao chiết được khảo sát thông qua hoạt động ức chế sự biến tính protein được thực hiện theo phương pháp của Shah *et al.* [18] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 150 μL cao chiết với 150 μL dung dịch albumin huyết thanh bò 5%. Sau đó, hỗn hợp được ủ ở 27°C trong 15 phút. Sự biến tính protein được gây ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 60°C trong 10 phút. Mẫu được đo mật độ quang tại bước sóng 660 nm. Diclofenac và prednisolon được sử dụng đối chứng dương.

2.7. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16. Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định tính thành phần hóa học các cao chiết

Kết quả định tính thành phần hóa học các cao chiết cho thấy sự có mặt của flavonoid, alkaloid, tannin. Ngoài ra, cao ethanol và n-hexane còn có steroid. Glycoside hiện diện trong cao ethanol và cao nước. Đặc biệt, trong cao nước còn có sự hiện diện của saponin. Nhóm chất flavonoid đã được biết đến là một

trong những polyphenol có hoạt tính sinh học cao trong việc ngăn ngừa các bệnh thoái hóa như ung thư và các bệnh tim mạch [19]. Từ việc định tính cho thấy trong lá cây Cò Sen chứa nhiều các nhóm hợp chất có tiềm năng sinh học.

3.2. Định lượng polyphenol và flavonoid trong các cao chiết

Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong cao chiết tăng dần theo thứ tự từ cao chiết n-hexane, dichloromethane, ethanol, ethyl acetate và nước (Bảng 1).

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các cao chiết lá cây Cò Sen

Cao chiết	Phương pháp định lượng	
	TPC (mg GAE/g cao chiết)	TFC (mg QE/g cao chiết)
Ethanol	11,22 ^b ±0,35	216,06 ^b ±13,97
n-Hexane	5,58 ^c ±0,10	115,10 ^d ±5,85
Dichloromethane	6,97 ^c ±0,51	140,74 ^c ±5,30
Ethyl acetate	12,70 ^a ±1,60	227,60 ^b ±6,73
Nước	13,85 ^a ±0,13	267,34 ^a ±4,93

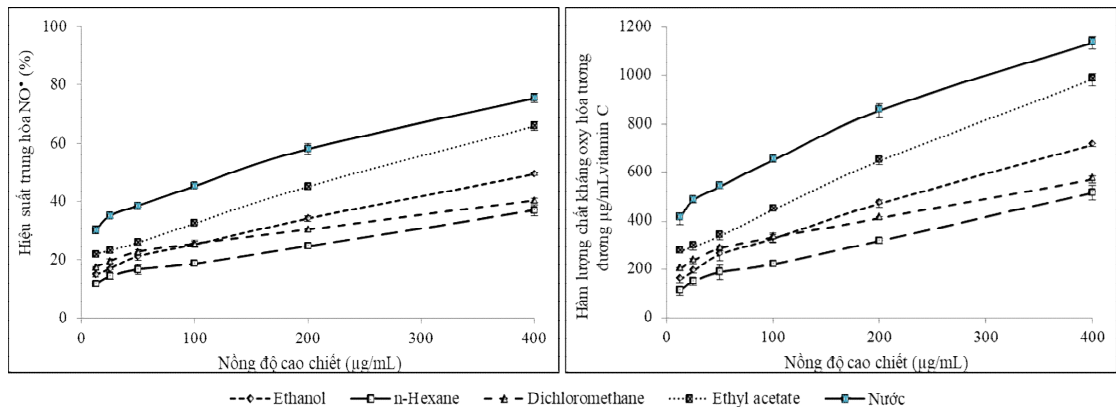
Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Như vậy, hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các cao chiết phụ thuộc vào loại dung môi chiết xuất, cụ thể là độ phân cực của dung môi được sử dụng để chiết xuất. Nước có thể chiết xuất các hợp chất phân cực (anthocyanin) cùng một số flavonoid, trong khi ethyl acetate có thể chiết xuất các hợp chất phenolic nhưng không phải anthocyanin. Một nghiên cứu khác trên loài *Dendrobium sonia* cũng cho thấy cao nước chứa hợp chất polyphenol cao hơn so với cao ethyl acetate và n-hexane do sự hiện diện của các anthocyanin [20]. Một số nghiên cứu trước đó cũng chỉ ra rằng độ tan của hợp chất polyphenol trong dung môi chiết xuất phụ thuộc vào độ phân cực của dung môi [21, 22]. Không chỉ polyphenol mà nghiên cứu này cũng

cho thấy độ tan của hợp chất flavonoid cũng phụ thuộc vào độ phân cực của dung môi.

3.3. Hoạt tính kháng oxy hóa

Gốc tự do nitric oxit hiển thị khả năng phản ứng quan trọng với một số loại protein và các gốc tự do khác [23]. Nitric oxit tự do được tạo ra từ natri nitroprusside, phản ứng với oxy tạo thành nitrite. Các cao chiết lá cây Cò Sen ức chế sự hình thành nitrite bằng cách cạnh tranh trực tiếp với oxy trong phản ứng với nitric oxit [24]. Hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết lá cây Cò Sen được khảo sát thông qua việc xác định hiệu suất trung hòa gốc tự do NO[•] và hàm lượng chất kháng oxy tương đương µg/mL vitamin C, kết quả được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Khả năng trung hòa gốc tự do NO[•] của các cao chiết lá cây Cò Sen

Dựa vào kết quả trình bày trong Hình 1 có thể thấy rằng, các cao chiết lá cây Cò Sen trung hòa gốc tự do NO[•] phụ thuộc theo nồng độ cao chiết và hàm lượng polyphenol, flavonoid đã khảo sát trước đó. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mối tương quan tích cực giữa hoạt tính kháng oxy hóa và hàm lượng polyphenol trong thực vật. Oki *et al.* [25] quan sát thấy rằng hoạt động trung hòa gốc tự do tăng dần theo hàm lượng polyphenol. Như vậy, cao nước lá cây Cò Sen có hiệu quả trung hòa gốc tự do cũng như hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương $\mu\text{g/mL}$ vitamin C nhiều hơn các cao chiết còn lại. Trong khi đó, cao n-hexane lá cây Cò Sen lại có hoạt tính kháng oxy hóa kém nhất. Khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết lá cây Cò Sen còn được đánh giá dựa vào nồng độ mà tại đó trung hòa được 50% gốc tự do được trình bày trong Bảng 2.

Các cao chiết có hoạt tính ức chế sự hình thành NO[•] cao hơn vitamin C. Khả năng ức chế sự hình thành NO[•] của các cao chiết tăng dần theo thứ tự n-hexane, dichloromethane, ethanol, ethyl acetate và nước. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng NO[•] có vai trò quan trọng trong các quá trình viêm khác nhau [26]. Độc tính của NO[•] tăng lên rất nhiều khi nó phản ứng với gốc superoxide, tạo thành anion peroxy nitrite phản ứng cao (ONOO) [27]. Như vậy, việc khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do NO[•] không chỉ xác định được hoạt tính kháng oxy hóa mà còn xác định được khả năng kháng viêm *in vitro* của các cao chiết lá cây Cò Sen.

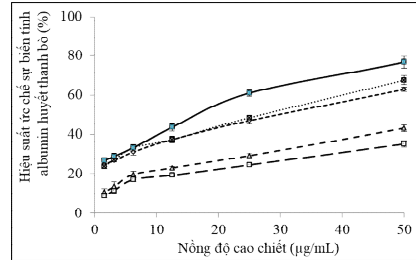
Bảng 2. Giá trị EC_{50} của các cao chiết lá cây Cò Sen

Cao chiết và chất chuẩn	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ethanol	397,74 ^d ±2,65
n-Hexane	611,42 ^b ±34,62
Dichloromethane	559,79 ^c ±17,33
Ethyl acetate	255,72 ^e ±8,34
Nước	157,08 ^f ±2,90
Vitamin C	727,05 ^a ±10,00

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

3.4. Hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Sự biến tính của protein là một trong những nguyên nhân gây viêm được chứng minh [28]. Hoạt tính kháng viêm của các cao chiết lá cây Cò Sen được khảo sát thông qua hoạt động ức chế sự biến tính của albumin huyết thanh bò (BSA) kết quả được trình bày trong Hình 2 và Bảng 3.



--- Ethanol — n-Hexane - - - Dichloromethane ... Ethyl acetate — Nước

Hình 2. Hiệu suất ức chế sự biến tính BSA của các cao chiết lá cây Cò Sen

Các cao chiết đã cho thấy ức chế nhiệt gây ra sự biến tính protein theo cách phụ thuộc vào nồng độ cao chiết. Cao nước có khả năng ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò cao nhất với hiệu suất ức chế sự biến tính tăng từ $26,59 \pm 1,72\%$ ở nồng độ $1,56 \mu\text{g/mL}$ tăng lên $76,78 \pm 2,83\%$ ở nồng độ $50 \mu\text{g/mL}$. Trong khi đó, cao n-hexane vẫn có hiệu suất ức chế kém nhất trong các loại cao chiết được khảo sát.

Bảng 3. So sánh giá trị IC_{50} của các cao chiết lá cây Cò Sen và các chất chuẩn

Cao chiết và chất chuẩn	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ethanol	31,55 ^c ±0,98
n-Hexane	77,98 ^a ±5,04
Dichloromethane	59,53 ^b ±2,52
Ethyl acetate	28,40 ^e ±1,01
Nước	21,13 ^d ±0,95
Diclofenac	0,57 ^e ±0,21
Prednisolon	0,39 ^e ±0,17

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Dựa vào giá trị IC_{50} trong Bảng 3, hoạt tính kháng viêm *in vitro* tăng dần theo thứ tự sau n-hexane, dichloromethane, ethanol, ethyl acetate và nước. Trong nghiên cứu này các cao chiết có khả năng kháng oxy hóa càng mạnh thì khả năng kháng viêm càng mạnh. Như vậy, có thể thấy

được sự tương quan của khả năng kháng oxy hóa và khả năng kháng viêm của các cao chiết lá cây Cò Sen. Mặc dù cao nước lá cây Cò Sen có hoạt tính kháng viêm mạnh hơn các cao chiết còn lại. Tuy nhiên, cao nước lá cây Cò Sen vẫn thể hiện hoạt tính kháng viêm yếu hơn các chất chuẩn dùng trong điều trị viêm là diclofenac 37,07 lần và prednisolon 54,18 lần.

4. KẾT LUẬN

Các cao chiết lá cây Cò Sen đều có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm. Hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính kháng viêm có mối tương quan tích cực với nhau và với hàm lượng polyphenol, flavonoid. Trong các loại cao chiết được khảo sát, cao nước có hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính kháng viêm mạnh nhất. Các cao chiết thể hiện hoạt tính trung hòa gốc tự do NO[•] mạnh hơn vitamin C, nhưng lại thể hiện hoạt tính ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò kém hơn diclofenac và prednisolon.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài "Sàng lọc, tuyển chọn các cây dược liệu có tại tỉnh An Giang đáp ứng sinh học bảo vệ gan, kháng ung thư, hỗ trợ điều trị đái tháo đường" do Sở Khoa học và Công nghệ Tỉnh An Giang quản lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Chiu, Y. J., Huang, T. H., Chiu, C. S., Lu, T. C., Chen, Y. W., Peng, W. H., Chen, C. Y. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11 (2012).

[2] Huang, G. J., Wang, B. S., Lin, W. C., Huang, S. S., Lee, C. Y., et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Pericarp. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10 (2012).

[3] Mizuno, Y., Jacob, R. F., Preston M. R. Inflammation and the development of atherosclerosis effects of lipid-lowering therapy. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **18(5)**, 351-358 (2011).

[4] Su, S., Wang, T., Duan, J. A., Zhou, W., Hua, Y. Q., Tang, Y. P., Yu, L., Qian, D. W. Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. *Journal of Ethnopharmacology* **134(2)**, 251-258 (2011).

[5] Rodrigo, L., De Francisco, R., Pérez-Pariente, J. M. Nimesulide-induced severe hemolytic anemia and acute liver failure leading to liver transplantation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **37(11)**, 1341-1343 (2002).

[6] Laine, L., Smith, R., Min, K., Chen, C., Dubois, R. W. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **24(5)**, 751-767 (2006).

[7] Nguyen, H. C., Lin, K. H., Huang, M. Y., et al. Antioxidant activities of the methanol extracts of various parts of *Phalaenopsis orchids* with white, yellow, and purple flowers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **46(2)**, 457-465 (2018).

[8] Yen, G. C., Chen, C. S., Chang, W. T., et al. Antioxidant activity and anticancer effect of ethanolic and aqueous extracts of the roots of *Ficus beecheyana* and their phenolic components. *Journal of Food and Drug Analysis* **26(1)**, 182-192 (2018).

[9] Moreno-Quirós, C. V., Sánchez-Medina, A., Vázquez-Hernández, M., Hernández Reyes, A. G., García-Rodríguez R. V. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Ternstroemia sylvatica* Schlttdl. & Cham. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **10(11)**, 1047-1053 (2017).

[10] Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., Świeca, M. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences* **23(5)**, 628-633 (2016).

[11] Zhao, Y., Chen, S., Wang, Y., Wang, J., Lu, J. Effect of drying processes on

- prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai. *Journal of Food and Drug Analysis* **26(2)**, 796-806 (2018).
- [12] Chuakul, W., Sornthorncharenon, N., Ethnomedical uses of Thai Annonaceous plant (1). *Thai J. Phytopharm* **10**, 25-32 (2003).
- [13]. Võ Văn Chi. *Cây thuốc An Giang*. Ủy Ban Khoa học Kỹ thuật An Giang, 154 (1991).
- [14]. Nguyễn Kim Phi Phụng. *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 80-147 (2007).
- [15] Rebaya, A., Belghith S. I., Baghdikian B., Leddet V. M., Mabrouki F., Olivier E., Cherif J. K. Ayadi M.T. Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **5(1)**, 52-57 (2014).
- [16] Bag, G. C., Devi P. G., Bhaigyabati T. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur Valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **30(1)**, 154-159 (2015).
- [17] Alisi, C. S., Onyeze, G. O. C. Nitric oxide scavenging ability of ethyl acetate fraction of methanolic leaf extracts of *Chromolaena odorata* (Linn.). *African Journal of Biochemistry Research* **2(7)**, 145-150 (2008).
- [18] Shah, M., Parveen Z., Khan M. R. Evaluation of antioxidant, antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of the stem bark of *Sapindus mukorossi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **17**, 526 (2017).
- [19] Claudine, M., Augustin, S., Christine, M., Christian, R. L. J. Polyphenol: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **5(1)**, 727-747 (2004).
- [20] Shafazila, T. S., Lee, P. M., Hung, L. K. Radical scavenging activities of extract and solvent-solvent partition fractions from *Dendrobium sonia* "Red Bom" flower," in Proceedings of the 2010. *International Conference on Science and Social Research*, 762-765 (2010).
- [21] De Abreu, I. N., Mazzafera, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology Biochemistry* **43(3)**, 241-248 (2005).
- [22] Galvez, C. J., Martin-Cordero, P., Houghton, A. M. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal Agricultural Food Chemistry* **53(6)**, 1927-1933 (2005).
- [23] Amaeze, S. O. U., Ayoola, G. A., Sofidiya, M. O., Adepoju-Bello, A. A., Adegoke, A. O., Coker, H. A. B. Evaluation of antioxidant activity of *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg) Hutch & Dalziel leaves. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-7 (2011).
- [24] Babu, B. H., Shylesh, B. S., Padikkala, J. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia* **72(3)**, 272-277 (2001).
- [25] Oki, T., Masuda, M., Furuta, S., Nishida, Y., Terahara, N., Suda, I. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *Journal of Food Science* **67(5)**, 1752-1756 (2002).
- [26] Shah, N. S., Billar, T. R. Role of nitric oxide in inflammation and tissue injury during endotoxemia and haemorrhagic shock. *Environmental Health Perspectives* **106(5)**, 1139-1143 (1998).
- [27] Huie, R. E., Padmaja, S. The reaction of no with superoxide. *Free Radical Research Communications* **18(4)**, 195-199 (1993).
- [28] Leelaprakash, G., Mohan, D. S., In-vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Encostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research* **3**, 185-196 (2011).