فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٦٦٨-٦٥٧ (۱۳۹۱)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره قسمت‌های هوایی گیاه *Bidens bipinnata* L. در مرحله میوه‌دهی

نغمه پیروزی[1*]، حسین آذرنیوند[2]، اصغر کهندل[3] و فرحناز خلیقی سیگارودی[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
پست الکترونیک: Naghmehpiroozi@yahoo.com
۲- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳- استادیار، پژوهشکده توسعه جهاد دانشگاهی واحد تهران
٤- استادیار، گروه پژوهشی فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۰

چکیده

گونه *Bidens bipinnata* L. متعلق به خانواده کاسنی (Compositae) و جنس Bidens است. به‌منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی عصاره متانولی گیاه *Bidens bipinnata* L.، تحقیقات انجام شد. به‌منظور بررسی فعالیت اثر آنتی‌اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدهای گیاه، پس از شناسایی کامل گیاه و مشخص شدن رویشگاه آن در منطقه کرج، قسمت‌های هوایی گیاه در مرحله میوه‌دهی جمع‌آوری گردید. در این بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه *Bidens bipinnata* L. با استفاده از سه روش ۱) DPPH، ۲) ABTS، ۳) FRAP، محتوای فلاونوئیدی و تام فنلی گیاه انجام شده‌است. نتایج نشان داد که IC_{50} درصد مهار رادیکال DPPH عصاره متانولی قسمت‌های هوایی گیاه *Bidens bipinnata* L.، معادل ۸۲/۱۳µg/ml می‌باشد (IC50 < ۱۰۰µg/ml). در روش FRAP میزان مصرف معرف سولفات آهن III بر گرم وزن خشک گیاه ۱۱۲/٦٦µM/g است. براساس نتایج روش ABTS میزان میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید معادل ۹/۱۵mg براساس وزن خشک گیاه است و همچنین میزان فلاونوئیدهای تام گیاه با استفاده از معرف روتین در وزن خشک گیاه ۱۲/۲۱mg/g و میزان ترکیب‌های فنلی تام عصاره گیاه با استفاده از معرف گالیک‌اسید ۲/۸۸mg/g تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: *Bidens bipinnata* L.، آنتی‌اکسیدان، DPPH، FRAP، ABTS.

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌های مهمی هستند که محافظت بدن را در مقابل تخریب ناشی از استرس‌های اکسیداتیو در اثر رادیکال‌های آزاد بر عهده دارند. انواع متفاوتی از مهارکننده‌های رادیکالی در بدن موجود است که اغلب آنها از رژیم غذایی مانند میوه‌ها، سبزیجات و نوشیدنی‌ها تأمین می‌شوند. به نظر می‌رسد که ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی غشای سلول‌ها را در مقابل صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند (Halliwell, 2000؛ Maxwell, 1995).

اخیراً فلاونوئیدها به‌عنوان ضدویروس، ضدرماتیسم و سیتوتوکسیک مورد مصرف قرار می‌گیرند (Villeda-

Archive of SID

www.SID.ir

Bidens bipinnata L. گیاه .(Hernández *et al*, 2001 متعلق به خانواده کاسنی و جنس Bidens می‌باشد. گیاهی یک‌ساله، ایستاده، تقریباً علفی، سبز و بدون کرک می‌باشد. ریشه این گیاه به‌صورت عمودی است و موسم گل در ماههای تیر و شهریور می‌باشد (قهرمان، ۱۳۷٤).

موطن اصلی این گیاه (دو دندان دو شاخه) جنوب آمریکا، اروپا، آسیا و جزایر آرام است. انتشار جغرافیایی این گونه در ایران در نقاطی از نواحی شمالی و مناطق اطراف تهران حالت بومی پیدا کرده و انتشار یافته‌است و بیشتر به‌صورت علف هرز در نقاط کاشته شده و زراعی، دشت‌ها، جنگل‌ها، نواحی از بین‌رفته، باغ‌ها و دشت‌ها، زیستگاه‌های نسبتاً مرطوب و کناره‌های جاده می‌روید (پیروزی، ۱۳۸۸). گیاه دو دندان دو شاخه با سابقه تاریخی دارای مصارف گوناگونی از قبیل مصارف دارویی، مصارف خوراکی و چاشنی غذا و مصارف علوفه‌ای (Alonzo & Hildebrans, 1999؛ Watt & Breyer-Brandwijk, 1962)، اثر درمانی از قبیل اثر ضددیابت (Huang *et al*., 2006)، اثر ضدزخم معده و ضداسهالی در موش صحرایی (Atta & Mouneir, 2005)، اثر محافظت‌کنندگی کبدی در موش صحرایی (Zhong *et al*., 2007) و اثر سیتوتوکسیک (Wang *et al*., 1997) و همچنین دارای ترکیب‌های شیمیایی عمده که شامل آلفا-پینن، بتا-میرسن، جرماکرن D، بی‌سیکلوجرماکرن، گاما-المن و اسپاتولنول (پیروزی، ۱۳۸۸) می‌باشد که توسط محققان بررسی شده‌است.

تاکنون هیچ‌گونه مطالعه علمی بر روی این گونه در زمینه محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه و اثر آنتی‌اکسیدانی انجام نشده‌است و بررسی‌های انجام شده بر روی گونه *Bidens bipinnata* مربوط به جداسازی ترکیب‌های فلاونوئیدی و بررسی اثر محافظ کبدی آن می‌باشد (Zhong *et al*., 2007 ؛Yuan *et al*.,2008) که به‌طور کلی با مطالعه حاضر متفاوت است، اما تحقیقاتی بر روی گونه‌های دیگر جنس Bidens انجام شده که از نظر داشتن اثرهای دارویی، با ارزش می‌باشند و نیز وجود اثر آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیک و تعدیل سیستم ایمنی را در گونه‌های جنس Bidens اثبات می‌کند.

مواد و روشها

جمع‌آوری گیاه مورد بررسی

پس از شناسایی رویشگاه گونه *Bidens bipinnata* L. در سطح شهرستان کرج، برای جمع‌آوری نمونه گیاهی به منطقه رویشی مراجعه شد و در زمانی‌که در منطقه مورد نظر گیاه به مرحله میوه‌دهی رسیده بود نمونه‌برداری انجام شد. سپس قسمت‌های هوایی میوه‌دار گیاه در دمای محیط و در سایه خشک گردیدند. نمونه برای شناسایی به هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی منتقل گردید. نمونه مذکور با نمونه موجود در هرباریوم پژوهشکده با کد (ACECR)604 تطبیق و نام علمی آن تعیین گردید.

مواد شیمیایی

کلیه حلال‌های شیمیایی از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) و مواد استاندارد و معرف‌های شیمیایی تست‌های آنتی‌اکسیدانی از شرکت سیگما (Sigma Steinheim, Germany) تهیه گردیدند.

مشخصات دستگاه اسپکتروفتومتر

دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش مدل X-ma2000pc ساخت شرکت Human corporation بود.

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه عصاره گیاه

عصاره‌گیری به روش خیساندن انجام گردید. قسمت‌های هوایی گیاه خشک و به‌طور کامل پودر شد. به مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه در ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول خیسانده و به مدت یک ساعت هم زده شد و بعد به مدت یک شب در هوای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن عصاره جدا و صاف شد. به رسوب باقیمانده دوباره ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و عصاره‌گیری همانند روز قبل تکرار گردید. بعد از ۳ روز کلیه محلول‌های جدا شده در حرارت ٤۰ درجه سانتی‌گراد و در فشار پایین تبخیر شد تا حلال به‌طور کامل خارج شده و وزن عصاره حاصل از گیاه محاسبه گردید. عصاره تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شد (Farhoosh *et al*., 2007).

بررسی میزان فلاونوئیدهای تام گیاه (Total Flavonoids)

محتوای فلاونوئیدهای تام عصاره گیاه با استفاده از سدیم نیتریت، آلومینیوم کلرید و هیدروکسید سدیم انجام شد (Zhishen *et al*., 1999). در این آزمایش غلظت‌های ۲۵۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول تهیه گردید و از روتین (Rutin) به‌عنوان ماده استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

بعد از تهیه غلظت‌های (stock) مورد نظر، ۳ تکرار از هر غلظت به میزان یک میلی‌لیتر برداشته و در بالن ژوژه‌های ۱۰ میلی‌لیتر ریخته و ٤ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه ۰/۳ میلی‌لیتر سدیم نیتریت به بالن‌ها اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه، ۰/۳ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم و بعد از ٦ دقیقه ۲ میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم به بالن‌ها اضافه شد و به‌طور کامل آنها را تکان داده، و با آب مقطر بالن‌ها را به حجم رسانده و بعد جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ماورای بنفش (UV) با آب مقطر، در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. بنابراین براساس عصاره و وزن خشک گیاه میزان فلاونوئید براساس میزان معادل "میلی‌گرم روتین در گرم عصاره" و "میلی‌گرم روتین در وزن خشک گیاه" محاسبه شد. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد.

بررسی میزان ترکیب‌های فنلی تام عصاره گیاه (Total Phenol)

بررسی محتوای تام فنلی با استفاده از روش Folin-Ciocalteu انجام شد (Singleton & Rossi, 1965). در این آزمایش غلظت‌های ۲۵۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول تهیه گردید و از گالیک‌اسید (Gallic acid) به‌عنوان ماده استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

از هر غلظت به میزان یک میلی‌لیتر برداشته و در بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر ریخته شد. یک بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر برداشته و با اضافه کردن آب مقطر حجم آن به ۲۵میلی‌لیتر رسانده شد و به‌عنوان شاهد مدنظر قرار داده شد. به بالن‌های مورد نظر به میزان ۹ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف Folin اضافه شد. سپس آنها را به خوبی تکان داده و بعد از مدت زمان ۵ دقیقه، ۱۰ میلی‌لیتر سدیم‌کربنات (Na_2CO_3) به همه آنها اضافه و بلافاصله بالن‌های مورد نظر را با آب مقطر به حجم رسانده، به شدت آنها را تکان داده و به مدت ۹۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه با درجه حرارت ۲۳ تا ۲۵ درجه نگهداری شدند. بعد از ۹۰ دقیقه جذب نمونه‌ها پس از تنظیم صفر دستگاه اسپکتروفتومتر uv با آب مقطر، در طول موج ۷۵۰ نانومتر ثبت شد. بنابراین براساس عصاره

Archive of SID

www.SID.ir

و وزن خشک گیاه میزان محتوای تام فنلی براساس میزان معادل "میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره" و "میلی‌گرم گالیک اسید در وزن خشک گیاه "محاسبه شد. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد.

بررسی فعالیت رادیکال آزاد DPPH

فعالیت رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005) انجام شد. در این آزمایش غلظت‌های ۱۰۰-۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول تهیه گردید و از آسکوربیک‌اسید (Ascorbic acid) به‌عنوان شاهد استفاده گردید. از هر غلظت با ۳ تکرار، ۱/۵ میلی‌لیتر عصاره برداشته با ۱/۵ میلی‌لیتر DPPH مخلوط و داخل لوله آزمایش ریخته، سپس در دستگاه ورتکس به شدت آنها را تکان داده و به مدت ۳۰ دقیقه آنها را در تاریکی رها می‌کنیم. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV با حلال متانول در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد.

درصد بازداری از DPPH نمونه با مقایسه نمونه عصاره و نمونه کنترل با استفاده از رابطه زیر بدست آمد:

درصد بازداری DPPH (٪) =

$$[1- (SSampel – SBblank sampel)/Ccontrol] \times 100\%$$

بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی-احیاءکنندگی فریک FRAP

بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی از طریق یون Fe^{3+} (FRAP) یک روش ساده و معتبر رنگ‌سنجی است و به‌طور معمول برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش توسط Benzie و Strain (۱۹۹۶) ارائه شد. معرف FRAP شامل ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول TPTZ ۱۰ میلی‌مولار در اسید هیدروکلریک (HCl) ۴۰ میلی‌مولار به اضافه ۲/۵ میلی‌لیتر از کلرید آهن (III) ($FeCl_3.6H_2O$) ۲۰ میلی‌مولار و ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار تا pH = ۳/٦ تهیه می‌شود. مخلوط مورد نظر را به شدت به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم می‌نماییم. سپس ۲۸۵۰ میکرولیتر معرف FRAP تازه تهیه شده با ۱۵۰ میکرولیتر عصاره مخلوط شده و مخلوط واکنشی تحت تکان شدید با دستگاه ورتکس (Vortex) قرار داده شد. بعد از ۱۵ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه جذب در ۵۹۳ نانومتر ارزیابی شده و داده‌ها به‌صورت ارزش FRAP بر حسب میلی‌مولار با استفاده از منحنی کالیبراسیون محلول Fe(II) در محدوده 200-000µM ($FeSO_4.7H_2O$) بیان می‌شوند. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاءکنندگی (آنتی‌اکسیدانی) خواهد بود. البته از آسکوربیک اسید به‌عنوان شاهد برای مقایسه استفاده شد.

بنابراین براساس عصاره و وزن خشک گیاه میزان $FeSO_4.7H_2O$ براساس میزان معادل "میکرومول $FeSO_4.7H_2O$ در گرم عصاره" و "میکرومول $FeSO_4.7H_2O$ در وزن خشک گیاه" محاسبه شد.

بررسی فعالیت رادیکال ABTS

برای بررسی فعالیت رادیکال ABTS از روش تغییر یافته Re و همکاران (۱۹۹۹) استفاده گردید. محلول‌های استوک شامل محلول $ABTS^{+\cdot}$ ۷ میلی‌مولار و محلول پتاسیم پرسولفات ۲/٤ میلی‌مولار بودند. برای تهیه محلول کار دو محلول استوک در

Archive of SID

www.SID.ir

مقادیر هم ارز با هم مخلوط شد. اجازه داده شد برای تکمیل واکنش به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی باقی بمانند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول ABTS را با ۸۸ میلی‌لیتر متانول رقیق نموده تا جذبی برابر ۰/۷۰۰ ±۰/۰۲ واحد در ۷۳٤ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر بدست آید. محلول +ABTS تازه تهیه شده برای هر آزمایش آماده شد. ۳۰ میکرولیتر عصاره‌های گیاه با ۲۹۷۰ میکرولیتر از محلول +ABTS مخلوط شد و جذب آنها بعد از ٦ دقیقه در ۷۳٤ نانومتر با اسپکتروفتومتر گرفته شد. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد. از اسکوربیک‌اسید به‌عنوان شاهد استفاده گردید. درصد مهار + ABTS نمونه با مقایسه نمونه کنترل با استفاده از رابطه زیر بدست آمد:

درصد فعالیت رادیکال +ABTS (٪) = [(Abscontrol-Abssample)]/(Abscontrol)] × 100

محاسبات آماری

تمام اندازه‌گیری‌ها ۳ بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به‌صورت Mean±SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک‌سویه (ANOVA) برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. نتایج با احتمال $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. سپس مقادیر IC50 از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه بدست آمد.

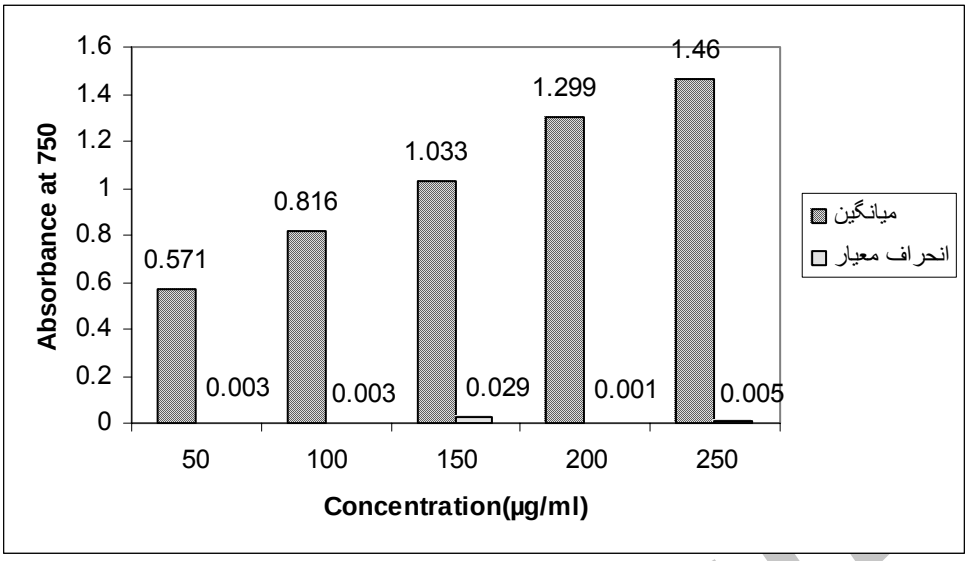
نتایج

محتوای فنل و فلاونوئید

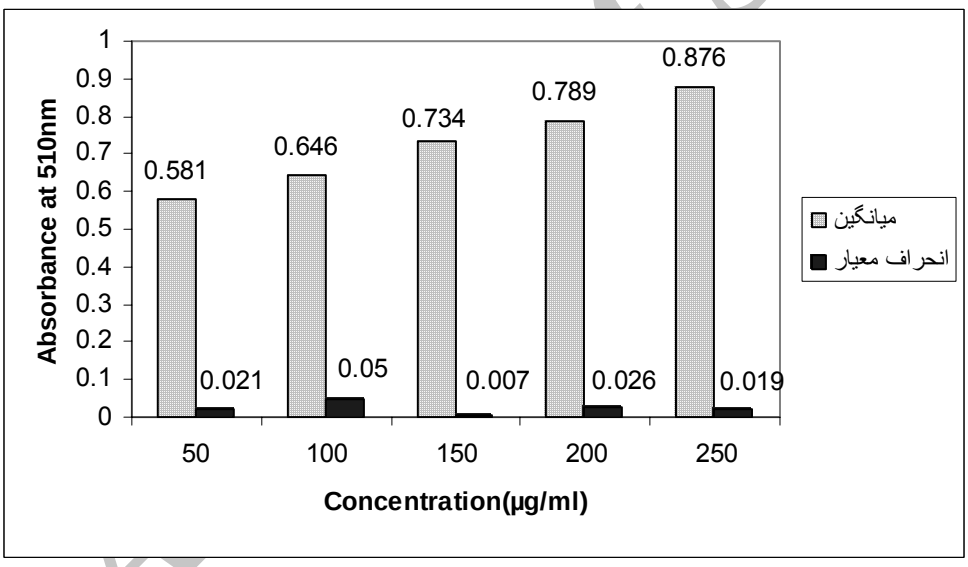
محتوای تام فنلی با متد فولین سیوکالتیو به‌صورت میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره و در گرم وزن خشک گیاه براساس معادله خط منحنی استاندارد (y= 0.0045x, r2= 0.995) محاسبه شد. محتوای تام فنلی برای عصاره متانولی و وزن خشک گیاه به‌ترتیب ۰/۵۷ ± ۲٦/٦٤ و ۰/۰٦ ± ۲/۸۸ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم پودر عصاره و وزن خشک گیاه بدست آمد.

شکل ۱ نمودار غلظت-پاسخ را در عصاره متانولی گالیک‌اسید نشان می‌دهد. در این تحقیق مشخص شد که میزان گالیک‌اسید در تمامی غلظت‌های عصاره با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های عصاره گیاه با گالیک‌اسید وجود داشت ($p < ۰/۰۵$). محتوای فلاونوئید نیز بر مبنای معادله خط منحنی استاندارد (y = 0.0015x, r2 = 0.996) برای همین مجموعه به‌ترتیب۱۸/۲۲ ± ۱۱۳/۰۵ و ۱/۹۷ ± ۱۲/۲۱ میلی‌گرم روتین در گرم پودر عصاره و وزن خشک گیاه بدست آمد. شکل ۲ نمودار غلظت-پاسخ را در عصاره متانولی روتین نشان می‌دهد. در این تحقیق مشخص شد که میزان روتین در تمامی غلظت‌های عصاره با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های عصاره گیاه با روتین وجود داشت ($p < ۰/۰۵$).

Archive of SID



شکل ۱- بررسی میزان گالیک‌اسید عصاره متانولی گیاه در غلظت (µg/ml)۲۵۰-۵۰

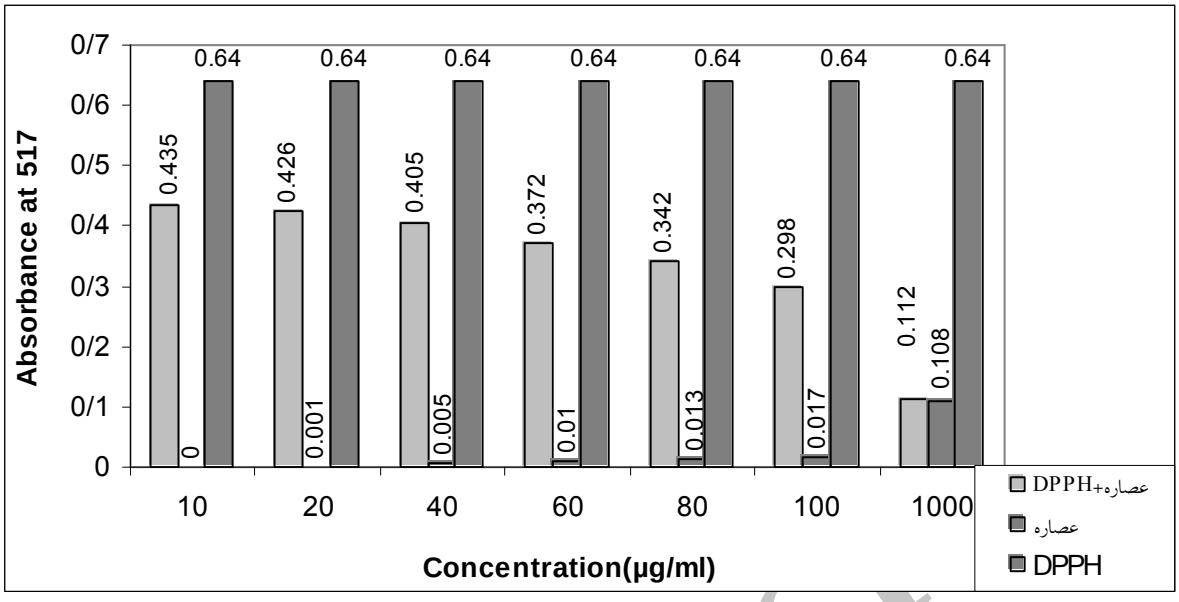


شکل ۲- بررسی میزان روتین عصاره متانولی گیاه در غلظت (µg/ml)۲۵۰-۵۰

فعالیت رادیکال DPPH

در این تحقیق مشخص شد که فعالیت به دام‌اندازی رادیکال در تمامی غلظت‌های عصاره با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. غلظت مهار ۵۰٪ (IC50) در عصاره متانولی گیاه ۰/۰۰۱ ± ۸۲/۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. IC50 برای آسکوربیک‌اسید ۰/۰۰۳ ± ۸/٦۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. شکل ۳ نمودار غلظت-پاسخ را در عصاره متانولی (عصاره +DPPH و عصاره و DPPH) نشان می‌دهد. البته اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های عصاره گیاه در فعالیت به دام‌اندازی رادیکال وجود داشت ($p < ۰/۰۵$).

www.SID.ir

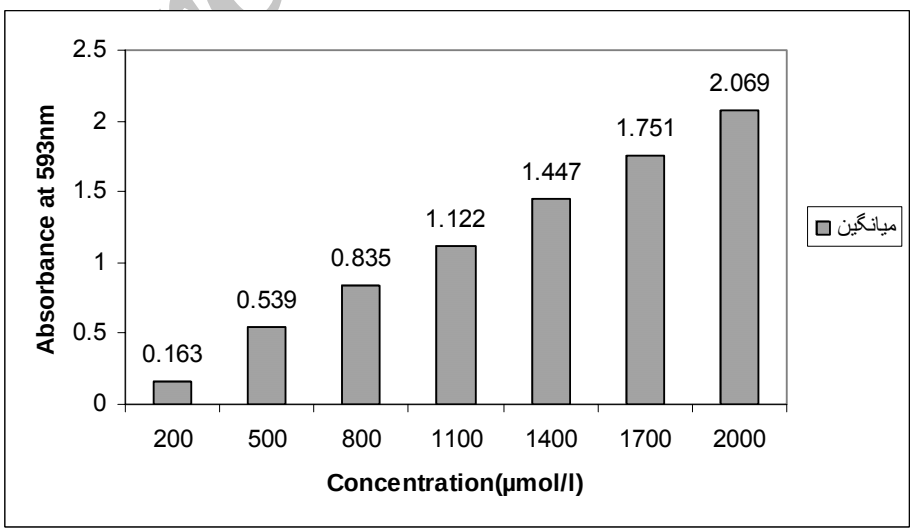


شکل ۳- بررسی فعالیت رادیکال DPPH عصاره متانولی گیاه در غلظت (µg/ml)۱۰۰۰-۱۰

قدرت احیاءکنندگی FRAP

در این تحقیق مشخص شد که قدرت احیاءکنندگی در تمامی غلظت‌های عصاره با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. محتوای سولفات‌آهن IV برای عصاره متانولی گیاه و وزن خشک گیاه به‌ترتیب ۱/۰۵ ± ۱۰٤۳/۱۹ و ۰/۱۱ ± ۱۱۲/٦٦ میکرومول سولفات‌آهن IV در گرم پودر عصاره و وزن خشک بدست آمد. سولفات‌آهن IV برای آسکوربیک‌اسید ۱/۷۷ ± ۱۰۸۱۳/۰۵۹ میکرومول در گرم بدست آمد.

شکل ٤ نمودار غلظت-پاسخ را در عصاره متانولی $FeSO_4.7H_2O$ نشان می‌دهد. البته اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های عصاره گیاه در قدرت احیاءکنندگی وجود داشت ($p < ۰/۰۵$).

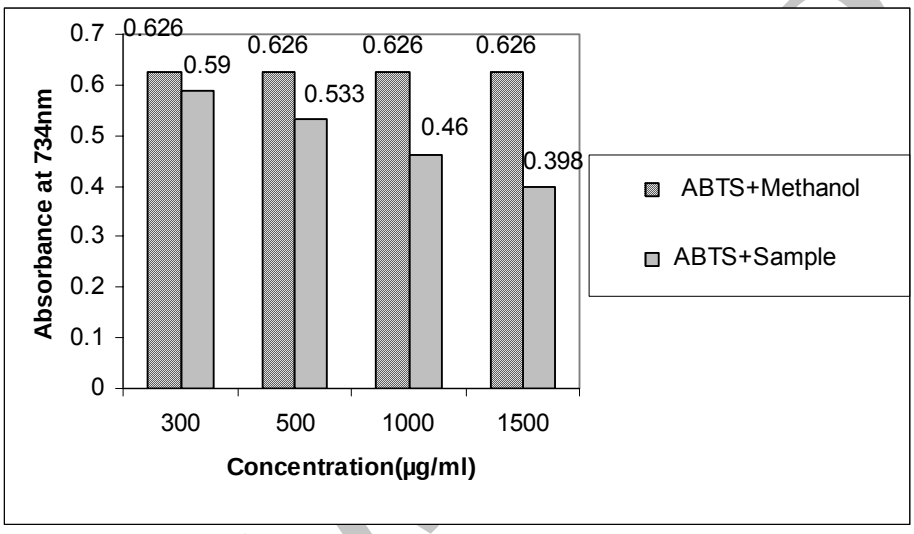


شکل ٤- بررسی قدرت احیاءکنندگی عصاره متانولی گیاه در غلظت(µmol/l) ۲۰۰۰-۲۰۰

Archive of SID
www.SID.ir

فعالیت رادیکال ABTS

نتایج نشان داد که فعالیت رادیکال ABTS در تمامی غلظت‌های عصاره با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. غلظت مهار ۵۰٪ (IC50) در عصاره متانولی گیاه ۰/۰۲ ± ۱۳۲۳/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. IC50 برای آسکوربیک اسید ۰/۰۰۲ ± ۱۱٤/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. همچنین میزان آسکوربیک‌اسید برای عصاره متانولی گیاه و وزن خشک گیاه به‌ترتیب ۰/٤۰ ± ۸٤/۷۷ و ۰/۰٤ ± ۹/۱۵ میلی‌گرم بر گرم پودر عصاره و وزن خشک بدست آمد. شکل ۵ نمودار غلظت-پاسخ را در عصاره متانولی ABTS نشان می‌دهد. البته اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های عصاره گیاه در فعالیت رادیکال ABTS وجود داشت ($p < ۰/۰۵$).



شکل ۵- بررسی فعالیت رادیکال ABTS عصاره متانولی گیاه در غلظت (µg/ml) ۱۵۰۰-۳۰۰

بحث

محتوای تام فنلی با متد فولین سیوکالتیو براساس معادله خط منحنی استاندارد برای عصاره متانولی و وزن خشک گیاه به‌ترتیب ۰/۵۷ ± ۲٦/٦٤ و ۰/۰٦ ± ۲/۸۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پودر عصاره و وزن خشک گیاه بدست آمد. محتوای فلاونوئید نیز بر مبنای معادله خط منحنی استاندارد برای همین مجموعه به‌ترتیب ۱۸/۲۲ ± ۱۱۳/۰۵ و ۱/۹۷ ± ۱۲/۲۱ میلی‌گرم روتین در گرم پودر عصاره و وزن خشک گیاه بدست آمد. عصاره متانولی گیاه به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای دارای مقادیر بالاتری از فنل تام و فلاونوئید نسبت به گیاه خام بود. فنل‌ها و ترکیب‌های پلی فنلی، مانند فلاونوئیدها به‌طور گسترده در محصولات غذایی یافت شده و نشان داده شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه‌ای دارند (Van Acker *et al.*,1996). مطالعات نشان داده که افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی، می‌تواند منجر به کاهش برخی بیماریها در انسان شود (Hertog *et al.*, 1993). میزان فنل تام و فلاونوئید در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره تهیه شده از گیاه را توجیه کند.

Archive of SID

www.SID.ir

اهمیت ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماریهای ناشی از رادیکال‌های آزاد شناخته شده‌است. با اینکه اتیولوژی بسیاری از بیماریها همچنان ناشناخته‌است، اما مشاهدات زیادی ثابت می‌کند که واکنش‌های اکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در ایجاد شرایط پاتولوژیک بسیاری از بیماریها ازجمله بیماریهای قلبی، نقص کلیوی، دیابت، سرطان، نقص ایمنی و پیری دارند (Noguchi & Niki, 2000). در این مطالعه نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که در روش DPPH، IC50 عصاره متانولی گیاه نسبت به IC50 آسکوربیک‌اسید دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکالی قوی می‌باشد (IC50 < ۱۰۰µg/ml). در روش FRAP قدرت احیاکنندگی آسکوربیک‌اسید نسبت به عصاره گیاه بهتر بوده‌است و در روش $ABTS^{\cdot+}$ آسکوربیک‌اسید اثر آنتی‌اکسیدانی بهتری را نسبت به عصاره گیاه نشان داد.

با توجه به این‌که در خصوص گونه *Bidens bipinnata* L. بررسی‌های صورت گرفته مربوط به جداسازی ترکیب‌های فلاونوئیدی و بررسی اثر محافظ کبدی آن می‌باشد، از این‌رو به‌طور کلی با مطالعه حاضر متفاوت بوده‌است، نتایج این تحقیقات که در ذیر به آنها اشاره شده وجود اثر محافظت کبدی را در گونه *Bidens bipinnata* اثبات می‌کند. طبق گزارشهای Zhong و همکاران (۲۰۰۷) و Yuan و همکاران (۲۰۰۸)، بر روی گونه *Bidens bipinnata* مشاهده شد که فلاونوئیدهای تام گیاه، اثر محافظت‌کنندگی کبدی قابل‌توجهی دارند و بخشی از مکانیسم اثر آنها به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد. ولی گونه‌های دیگر جنس Bidens نیز از نظر داشتن اثرهای دارویی با ارزش می‌باشند. ازجمله نتایج سایر تحقیقات که در ذیر به آنها اشاره شده‌است، وجود اثرهای آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیک و تعدیل سیستم ایمنی می‌باشد که در گونه‌های جنس Bidens آن را اثبات می‌کند. این فعالیت‌ها به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم به آنتی‌اکسیدان‌ها مرتبط می‌شوند. به‌عنوان مثال طبق گزارش Chiang و همکاران (۲۰۰۷)، بر روی گونه *B. pilosa* مشاهده گردید که ترکیب‌های فلاونوئیدی گیاه می‌توانند باعث تعدیل سیستم ایمنی شوند. در مطالعه دیگری بر روی این گیاه Deba و همکاران (۲۰۰۸)، اسانس و عصاره‌های آبی *B. pilosa* را برای اثر آنتی‌اکسیدان به روش DPPH در معرض آزمایش گذاشتند. میزان C50 اسانس و عصاره‌های آبی به‌ترتیب ٤٧/٥µg/ml و ٤٩/٧ بودند که این یافته‌ها نشان‌دهنده این است که گیاه دارای اثر آنتی‌اکسیدان می‌باشد. براساس گزارش Chiang و همکاران (۲۰۰٤)، ترکیب‌های موجود در عصاره گیاه *B. pilosa* اثرهای آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک قابل‌توجهی داشته‌اند و در یافته‌های مرتبطی طبق تحقیقات Abajo و همکاران (۲۰۰٤)، اثر دم‌کرده آبی این گیاه در پیشگیری از همولیز ناشی از رادیکال‌های آزاد و همچنین اثر تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی نشان داده شده‌است.

Zhu و همکاران (۲۰۰۹)، به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قسمت‌های هوایی گیاه *B. ceruna* به روش DPPH پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که ناشی از وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی است. طبق گزارش Wolniak و همکاران (۲۰۰۷)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های سرشاخه‌های گلدار گیاه *B. tripartita* نسبت به عصاره گیاه دو برابر بیشتر مشاهده شده‌است. نتایج نشان داد که

Archive of SID

www.SID.ir

این افزایش مربوط به ترکیب‌های فلاونوئیدی به میزان بالا در سرشاخه‌های گلدار گیاه می‌باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات دیگر، اثر آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های *B. pilosa* و *B. bipinnata* وجود داشت، ولی میزان IC50 این دو گونه متفاوت بود که می‌تواند ناشی از شرایط اقلیمی، متغیرهای آزمایش و روشهای متفاوت اندازه‌گیری باشد. همچنین در تحقیقات دیگر، دو گونه *B. ceruna* و *B. tripartita* اثر آنتی‌اکسیدانی به میزان بالا را دارا بودند که این افزایش در اثر ترکیب‌های فلاونوئیدی بوده‌است، پس این احتمال می‌تواند وجود داشته باشد که اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه مورد مطالعه ناشی از وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی باشد. همچنین گونه *B. pilosa* دارای اثرهای سیتوتوکسیک و تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی می‌باشد که ناشی از وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی است (Chiang *et al.*, 2007؛ Chiang *et al.*, 2004؛ Deba *et al.*, 2008؛ Abajo *et al.*, 2004).

بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه در زمینه اثر آنتی‌اکسیدان و ترکیب‌های فنلی تام و فلاونوئیدها می‌توان نتیجه گرفت که به‌دلیل دارا بودن اثر آنتی‌اکسیدانی این گیاه قابلیت بالقوه استفاده در درمان و پیشگیری بسیاری از بیماریها نظیر دیابت، التهاب، سرطان، صدمات کبدی، آلزایمر و بیماریهای عروق کرونر قلب را پس از تحقیقات لازم داشته باشد. همچنین از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان مواد محافظ در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شوند و این گیاه نیز دارای ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی است که این ترکیب‌ها مسئول اثر آنتی‌اکسیدان می‌باشند و اخیراً فلاونوئیدها به‌عنوان ضدویروس، ضدروماتیسم و پیشگیری‌کننده از بیماریهای قلبی- عروقی مورد مصرف قرار می‌گیرند، بنابراین کاربرد چنین گیاهانی در صنایع غذایی و کاهش سیر بیماری در طیف وسیعی از بیماریها می‌تواند مطرح باشد.

منابع مورد استفاده

- پیروزی، ن.، ۱۳۸۸. بررسی خصوصیات اکولوژیکی و اثرات آنتی‌اکسیدانی قسمت‌های هوایی گیاه دو دندان دوشاخه (*Bidens bipinnata* L.) و ترکیبات شیمیایی اسانس در کرج. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.
- قهرمان، ا.، ۱۳۷٤. فلور رنگی ایران (جلد چهاردهم). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.
- Abajo, C., Boffill, M.A., Del Campo, J., Mendez, M.A., Gonzalez, Y., Mitjans, M. and Vinardell, M.P., 2004. In Vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. Journal of Ethnopharmacology, 93(2-3): 319-323.
- Alonzo, D.S. and Hildebrans, J.W., 1999. *Bidens* L.: 150-155. In: Padva, L.S.D., Bunyapraphatsara, N. and Lemmens, R.H.M.J., (Eds). Plant Resources of South-East Asia No 12(1). Medicinal and Poisonous Plants 1. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, 711p.
- Atta, A.H. and Mouneir, S.M., 2005. Evaluation of some medicinal plant extracts for antidiarrhoeal activity. Phytotherapy Research, 19(6): 481-485.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1):70-76.
- Chiang, Y.M., Chang, C.L.T., Chang, S.L., Yang, W.C. and Shyur, L.F., 2007. Cytopiloyne, a novel polyacetylenic glucoside from *Bidens pilosa*, functions as a T helper cell modulator. Journal of Ethropharmacology, 110(3): 532-538.
- Chiang, Y.M., Chuang, D.Y., Wang, S.Y., Kuo, Y.H., Tsai, W. and Shyur, L.F., 2004. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. Journal of Ethropharmacology, 95(2-3): 409-419.
- Deba, F., Xuan, T.D., Yasuda, M. and Tawata, S., 2008. Chemical composition antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. Food Control, 19(4): 346-352.

Archive of SID

www.SID.ir

- Farhoosh, R., Golmovahhed, G.A. and Khodaparast, M.H., 2007. Antioxidant activity of various (*Camellia sinensis* L.). Food Chemistry, 100(1): 231-236.
- Halliwell, B., 2000. The antioxidant paradox. Lancet, 355: 1179-1180.
- Hertog, M.L.G., Feskens, E.J.M., Hollman, P.H.C., Katan, M.B. and Kromhout, D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the zutphen elderly study. Lancet, 342: 1007-1011.
- Huang, M.Z., Chen, H.S.m., Liu, J.G., Zou, X.H., Du, J.L. and Xiang, Z.B., 2006. Studies on the chemical constituents of *Bidens bipinnata* L. Academic Journal of Second Military Medical University, 27(8): 881-891.
- Liyanan-pathirana, C.M. and Shahidi, F., 2005. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(7): 2433-2440.
- Maxwell, S.R.J., 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. Drugs, 49(3)345-361.
- Noguchi, N. and Niki, E., 2000. Phenolic antioxidant: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. Free Radical Biology and Medicine, 28(10): 1538-1546.
- 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 Radical Biology and Medicine, 26(9-10): 1231-1237.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.r., J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - Phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticuture, 16(3): 144-158.
- Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgah, W.J.F. and Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine, 20(3):331-342.
- Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruíz, C., Huerta-Romero, R. and Río, C., 2001. Enhanced Brain regional Lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. Brain Research Bulletin, 55(2): 247-251.
- Wang, J., Qin, H., Zhang, H., Wang, M., Zhang, L., Wang, Y., Guo, M. and Mao, H., 1997. Inhibition of 5 Compounds from *Bidens bipinnata* on leukemia cells in vitro. Zhong yao cai Zhongyaocai Journal of Chinese medicinal materials, 20(5): 247-249.
- Watt, J.M. and Breyer-Brandwijk, M.G., 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. E. and. S. Livingstone, London, United kingdom, 1457p.
- Wolniak, M., Tomczykowa, M., Tomczyk, M., Gudej, J. and Wawer, I., 2007. Antioxidant activity of extracts and flavonoids from *Bidens tripartita*. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drag Research, 63(5): 441-447.
- Yuan, L.P., Chen, F.H., Ling, L., Bo, H., Chen, Z.W., Li, F., Zhong, M.M. and Xia, L.J., 2008. Protective effects of total flavonoids of *Bidens bipinrata* L. against carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rat. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 60(10): 1393-1402.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W., 1999. The determination of Flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64(4): 555-559.
- Zhong, M.M., Chen, F.H., Yuan, L.P., Wang, X.H., Wu, F.R., Yuan, F.L. and Cheng, W.M., 2007. Protective effect of total flavonoids from *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. Journal of pharmacy and pharmacology, 59(7): 1017-1025.
- Zhu, N., Li, X.W., Liu, G.Y., Shi, X.L., Gui, M.Y., Sun, C.Q. and Jin, Y.R., 2009. Constituents from aerial parts of *Bidens ceruna* L. and their DPPH radical scavenging activity. Chemical Research in Chinese Universities, 25(3):328-331.

Archive of SID

www.SID.ir

Antioxidant activity of the aerial parts extract of *Bidens bipinnata* L. at fruiting stage

N. Piroozi[1*], H. Azarnivand[2], A. Kohandel[3] and F. Khalighi-Sigaroodi[4]

1*- Corresponding author, MSc. Student, Research & Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
E-mail: Naghmehpiroozi@yahoo.com
2- Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Technology Development Institute, Jahad Daneshgahi, Tehran Unit, Karaj, Iran
4- Research Institute of Medicinal Plants, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Karaj, Iran

Received: December 2010 Revised: July 2011 Accepted: July 2011

Abstract

Bidens bipinnata L. belongs to the family Asteraceae (Compositae) and genus of *Bidens*. In order to study the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of methanolic extract of *Bidens bipinnata* L., were investigated. For this purpose, after full identification of the species and determination of its habitat in Alborz province, aerial parts of the plant were collected at fruiting stage. In this research, three methods including DPPH, ABTS, and FRAP were applied to measure flavonoid and total phenolic content of the species. Results showed that for methanol extract of the aerial parts of Bidens bipinnata, percentage of radical inhibition was 82.13 µg/ml (IC50 <100 µg/ml). The amount of ferrous sulfate reagent was 112.66 µM/g based on the dry weight of plant in FRAP method. According to the results of ABTS method, the amount of Ascorbic Acid, total flavonoids and total phenolic compounds were respectively calculated based on the dry weight of plant as 9.15 mg and also the amount of total flavonoids in dry weight of plant using rutin reagent was determined 12.21 mg/g and the amount of total phenolic compounds of the extract using Gallic Acid reagent was determined 2.88 mg/g.

Key words: *Bidens bipinnata* L., antioxidant, DPPH, FRAP, ABTS.

Archive of SID

www.SID.ir