مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.355808.3056
جلد ۳۷، شماره ۶، صفحه ۹۸۷-۹۷۱ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.6.6.7

بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss. در مراحل مختلف فنولوژی

مجید شریفی‌راد[۱*]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشگاه زابل، زابل، ایران، پست الکترونیک: Majidsharifirad@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰ | تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

چکیده

مشگک (*Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss.) یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده چتریان است که استفاده از آن در درمان اختلالات عصبی توصیه شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات محتوای ترکیب‌های فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی عصاره اتانولی گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی (رویشی، گلدهی و بذردهی) بود. نمونه‌برداری از سرشاخه‌های هوایی گیاه در هر مرحله به‌صورت تصادفی انجام گرفت. محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره اتانولی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH تعیین شد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاه با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*) و گرم منفی (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*) بررسی گردید. همچنین، فعالیت ضد التهابی عصاره گیاه با استفاده از روش پایداری غشای گلبول قرمز ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بین مراحل مختلف فنولوژی از نظر میزان فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل (به‌ترتیب ۱/۷ ± ۱۴۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک و ۱/۵ ± ۹۷ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی در مرحله گلدهی به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که عصاره گیاهی مورد مطالعه اثر بازدارندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارد. نتایج بیانگر آن است که عصاره اتانولی گونه *D. anethifolia* می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری و ضد التهاب امیدوار کننده در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شود. همچنین، مرحله گلدهی بهترین زمان برداشت جهت بهره‌برداری دارویی از این گونه معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد باکتریایی، فعالیت ضد التهابی، *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss.، فنولوژی.

مقدمه

یکی از مهمترین منابع غذایی و دارویی برای بشر گیاهان هستند. گیاه‌درمانی شاخه‌ای از طب سنتی است که نقش تعیین‌کننده‌ای در درمان بیماری‌ها دارد. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که به‌دلیل عوارض جانبی کمتر داروهای گیاهی در قیاس با داروهای شیمیایی، در سال‌های اخیر مردم دنیا گرایش بیشتری به مصرف داروهای گیاهی پیدا کرده‌اند (Nisar *et al*., 2018). بسیاری از داروهای مهم که به‌طور

گسترده‌ای در درمان بیماری‌های مختلف ناشی از عفونت‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی تا بیماری‌های قلبی–عروقی و یا حتی بیماری‌های مزمن و صعب‌العلاج مانند سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای منشأ طبیعی هستند (Wintola & Afolayan, 2015). گیاهان منبع مهمی از ترکیب‌های فعال از قبیل فنل‌ها، ترپنوئیدها، اجزای معطر، روغن‌های اساسی، استرول‌ها، آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدها، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها هستند که نقش مهمی در درمان بیماری‌های مختلف دارند (Sharifi-Rad *et al*., 2020). در دهه‌های اخیر، توجه زیادی به بررسی فعالیت‌های زیستی (فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد التهابی) گیاهان دارویی شده است. ثابت شده است که گیاهان حاوی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی متنوعی هستند و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی عمدتاً با مواد شیمیایی موجود در آنها مرتبط است (Altemimi *et al*., 2017).

یکی دیگر از موضوعاتی که در درمان بیماری‌ها به‌طور خاص بیماری‌های عفونی باید مورد توجه قرار بگیرد این است که مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی و نیمه‌سنتزی به سرعت در حال افزایش است (Zhivich, 2017). علاوه‌بر این، این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد عوارض جانبی متعددی از قبیل سرکوب سیستم ایمنی و یا ایجاد حساسیت می‌شوند (Tsuruga *et al*., 2007). برای رفع این مشکلات جستجو و کشف عوامل ضد میکروبی جدید دارای اهمیت است که نه تنها قادر به سرکوب عفونت‌های باکتریایی باشند بلکه بتوانند با تقویت عملکردهای ایمنی اثر طولانی مدتی داشته باشند (Rojas *et al*., 2006). با توجه به اینکه گیاهان دارای ترکیب‌های ضد میکروبی متنوعی هستند که به‌علت داشتن منشأ طبیعی در مقایسه با داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیشتری با بدن انسان هستند و عوارض جانبی کمتری را باعث می‌شوند (Toyang & Verpoorte, 2013)، ازاین‌رو می‌توانند به‌عنوان عوامل ضد میکروبی مورد توجه قرار بگیرند (Shahid *et al*., 2009). سازوکار اثرگذاری ترکیب‌های ضد میکروبی حاصل از گیاهان در قیاس با آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت است که این موضوع از نظر بالینی در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی دارای اهمیت فراوانی است (Górniak *et al*., 2019).

داروهایی که در حال حاضر برای درمان و یا کاهش التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرند به‌طور عمده از مواد مخدر و یا سالیسیلات و کورتیکوستروئیدها بدست می‌آیند که علاوه‌بر خاصیت سمّی دارای عوارض جانبی زیادی هستند. از این‌رو امروزه بررسی و کاربرد فرآورده‌های طبیعی و به‌طور خاص فرآورده‌های گیاهی برای درمان التهاب به‌دلیل عوارض جانبی کمتر مورد توجه محققان قرار گرفته است (Nunes *et al*., 2020). Hoodgar و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی به بررسی اثر ضد دردی و ضد التهابی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه *Securigera securidaca* پرداختند. نتایج نشان داد که عصاره گیاه مذکور در غلظت‌های مختلف دارای اثر ضد التهابی قابل توجهی است. Bag و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی قابلیت ضد التهابی عصاره میوه گیاه *Terminalia chebula* با استفاده از روش پایداری غشای گلبول قرمز پرداختند. نتایج آنان نشان داد که عصاره مذکور در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین فعالیت ضد التهابی (۹۶/۷۲٪) است.

مشگک (*Ducrosia anethifolia* Boiss) متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) و گیاهی دارویی– مرتعی است. این گیاه از گیاهان بومی ایران بوده ولی در افغانستان، پاکستان، سوریه، لبنان، عراق و برخی دیگر از کشورهای عربی و کشورهای حاشیه خلیج فارس نیز رویش دارد (Mottaghipisheh *et al*., 2014). در طب سنتی از آن برای درمان کمردرد و سردرد استفاده می‌شود. همچنین گونه‌های مختلف این جنس دارای خواص ضد اضطراب و آرام‌بخش بوده و از آنها برای تولید داروهای ضد افسردگی نیز استفاده می‌شود (Haghi *et al*., 2004). براساس تحقیقات انجام شده گونه‌های این جنس دارای فواید متعددی ازجمله خواص ضد دیابت، ضد میکروبی، ضد التهاب، ضد سرطانی و مهار رادیکال‌های آزاد هستند (Mottaghipisheh *et al*., 2018؛ Stavri *et al*., 2003).

با توجه به وجود میزان قابل توجه گونه‌های مرتعی- دارویی در کشور، بررسی ارزش دارویی این گونه‌ها در رویشگاه‌های مختلف در طی مراحل مختلف فنولوژی می‌تواند به مدیران، تصمیم‌گیران و بهره‌برداران کمک کند تا برای بهره‌برداری اصولی و به‌موقع از این گونه‌ها برنامه‌ریزی و اقدامات لازم را انجام دهند. ازاین‌رو هدف از این مطالعه بررسی تغییرات محتوای ترکیب‌های فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی عصاره اتانولی گونه *D. anethifolia* طی مراحل مختلف فنولوژی (رشد رویشی، گلدهی و بذردهی) در مراتع سراوان بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

نمونه‌برداری از قسمت‌های هوایی گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی (رویشی، گلدهی و بذردهی) از ۳۰ پایه به‌طور تصادفی انجام شد که پس از مخلوط کردن نمونه‌ها ۳ تکرار برای انجام هر آزمایش در نظر گرفته شد. پس از برداشت، نمونه‌ها به‌طور جداگانه در پاکت قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از تمیز کردن، نمونه‌ها به دور از نور مستقیم آفتاب و در دمای اتاق خشک شدند. سپس نمونه‌های خشک شده به‌وسیله آسیاب برقی تبدیل به پودر شدند. در اثر این فرایند سطح تماس آنها با حلال افزایش یافته و استخراج عصاره بهتر انجام شد.

تهیه عصاره

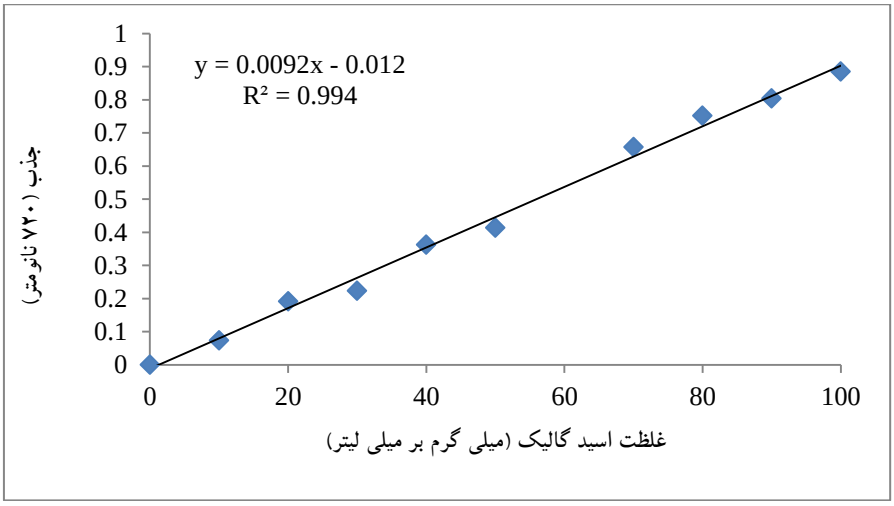
ابتدا ۱۰ گرم از نمونه‌های گیاهی آسیاب شده را وزن کرده و درون ارلن ریخته شد. پس از آن ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ (اتانول-آب مقطر) به آن اضافه گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت بر روی همزن قرار داده شد. بعد از گذشت این مدت، عصاره‌های حاصل به‌وسیله کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شده و با استفاده از دستگاه روتاری در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد جداسازی حلال از عصاره انجام گردید (Weli *et al*., 2018). سپس عصاره‌های حاصل در زیر جریان ازت قرار گرفتند تا بدین وسیله باقیمانده حلال به‌طور کامل تبخیر شود. در نهایت در نتیجه این فرایند، یک عصاره قیری شکل بدست آمد. با توجه به حساسیت زیاد عصاره‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین فنل کل

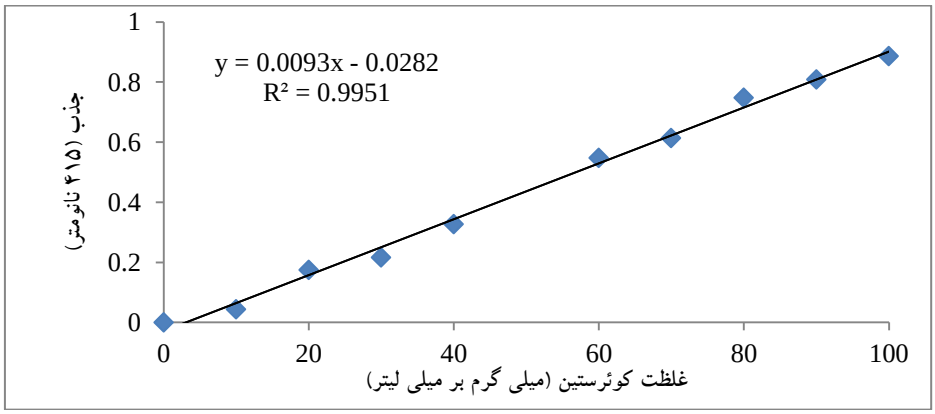
محتوای ترکیب‌های فنلی عصاره‌ها با روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالچو (Folin–Ciocalteu) اندازه‌گیری شد. برای انجام این کار به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره از مراحل مختلف رشد گیاه (در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲٪)، ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو (۵۰٪) اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف اسید گالیک استفاده گردید (شکل ۱). میزان فنل کل براساس میلی‌گرم برابر اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه بیان شد (Meda *et al*., 2005).

تعیین فلاونوئید کل

برای تعیین میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها (در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰٪، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استات پتاسیم ۱ مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر اضافه شد و به‌مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس جذب آنها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کوئرستین استفاده شد (شکل ۲). مقدار فلاونوئید کل براساس میلی‌گرم برابر کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه بیان گردید (Chang *et al*., 2002).



شکل ۱- منحنی استاندارد اسید گالیک



شکل ۲- منحنی استاندارد کوئرستین

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش میزان مهار رادیکال آزاد 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) استفاده شد. بدین‌منظور ۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) هر عصاره با ۲ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH (۳۰۰ میکرومولار) ترکیب گردید. از یک آنتی‌اکسیدان استاندارد به نام بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA) در غلظت‌های مشابه با عصاره‌ها برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها استفاده شد. محلول‌های حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند و بعد میزان جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. درصد مهار رادیکال آزاد (I٪) هر یک از عصاره‌ها به کمک فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد مهار رادیکال آزاد =

(جذب نمونه – جذب کنترل) / جذب کنترل × ۱۰۰

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی

روش انتشار دیسک

فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاه با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی باکتری‌های گرم مثبت

(*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)) و گرم منفی (*Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)) بررسی شد. بدین صورت که ابتدا با استفاده از محلول دی‌متیل سولفوکساید (DMSO: Dimethyl Sulfoxide) غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید. محلول‌های حاصل با عبور از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتر استریل و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Das *et al*., 2010). برای انجام آزمایش، دیسک‌های استریل کاغذی (دارای قطر ۶ میلی‌متر محصول شرکت پادتن طب ایران) به تعداد لازم به مدت ۶ ساعت در غلظت های مختلف عصاره ها قرار گرفتند تا عصاره ها کاملاً به دیسک ها جذب شود. سپس دیسک ها را به آون ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل کرده تا دیسک ها خشک شوند. از سوسپانسیون نیم مک‌فارلندی ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه با استفاده از سواپ استریل به صورت چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت شد. دیسک های آغشته شده به غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با فاصله استاندارد (۱/۵ سانتی‌متر) از یکدیگر بر روی محیط های کشت قرار گرفتند. دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) به‌عنوان شاهد مثبت و دیسک حاوی حلال خنثی DMSO به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. هر یک از دیسک ها در سه تکرار بر روی محیط کشت قرار گرفتند. سپس پتری‌دیش‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از گذشت این مدت قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر به‌وسیله کولیس اندازه‌گیری و میانگین آنها گزارش شد (Rankovič *et al*., 2010).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) براساس روش براث میکرودایلوشن (Broth Microdilution) با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد انجام شد (MyungJin *et al*., 2012). بدین‌منظور از غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها شامل ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷، ۹/۴، ۴/۷ و ۲/۳ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت ها به‌صورت جداگانه به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولرهینتون براث به آنها اضافه گردید. پس از آن به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک‌فارلندی ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) هر یک از باکتری های مورد مطالعه به‌صورت جداگانه اضافه شد. در نهایت میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. رشد باکتریایی به‌وسیله میزان جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا مدل Start fax 2100 اندازه گیری شد. مقدار MIC نشان‌دهنده حداقل غلظتی از عصاره‌هاست که رشد میکروارگانیسم‌ها را مهار می‌کند.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

میزان حداقل غلظت کشندگی (MBC) براساس نتایج حاصل از MIC تعیین شد. بدین صورت که از چاهک‌هایی که در آنها رشد باکتری‌ها مهار شده بود به‌وسیله سواپ بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت حداقل غلظتی از عصاره‌های مختلف که مانع از رشد باکتری‌ها شدند به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) بیان گردیدند (Das *et al*., 2010).

تعیین فعالیت ضد التهابی

فعالیت ضد التهابی عصاره های مختلف با استفاده از روش پایداری غشای گلبول قرمز ارزیابی شد (Vane & Botting, 1995). بدین صورت که ابتدا نمونه های خون از ۱۰ داوطلب سالم که در دو هفته قبل از نمونه‌گیری هیچ داروی ضد التهابی مصرف نکرده بودند گرفته شد. نمونه‌ها به لوله‌های هپارینه منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ

شدند. سلول‌های خونی بدست‌آمده را با سرم نرمال سالین شسته و برای تهیه سوسپانسیون گلبول‌های قرمز خون (۱۰٪ حجمی/حجمی) در نرمال سالین مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل برای ارزیابی فعالیت ضد التهابی عصاره‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بر این اساس، مقدار ۱ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره ها (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به‌طور جداگانه با ۲ میلی لیتر ۰/۳۶٪ نرمال سالین، ۱ میلی لیتر از ۰/۱۵ مولار بر لیتر بافر فسفات (با اسیدیته ۷/۴) و ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز خون مخلوط شدند. در گروه شاهد به جای عصاره‌های مختلف از نرمال سالین استفاده گردید. دیکلوفناک سدیم در غلظت های مشابه با عصاره ها برای مقایسه فعالیت ضد التهابی عصاره‌ها استفاده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دستگاه بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت مایع رویی برداشت شد و جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. درصد خاصیت پایدارکنندگی یا تثبیت غشای گلبول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

= خاصیت پایدار کننده غشاء (٪)

۱۰۰ × جذب کنترل / (جذب نمونه- جذب کنترل)

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌های حاصل از بخش‌های مختلف مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۵ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵٪ انجام شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید. تمامی بررسی‌ها در سه تکرار انجام شد.

نتایج

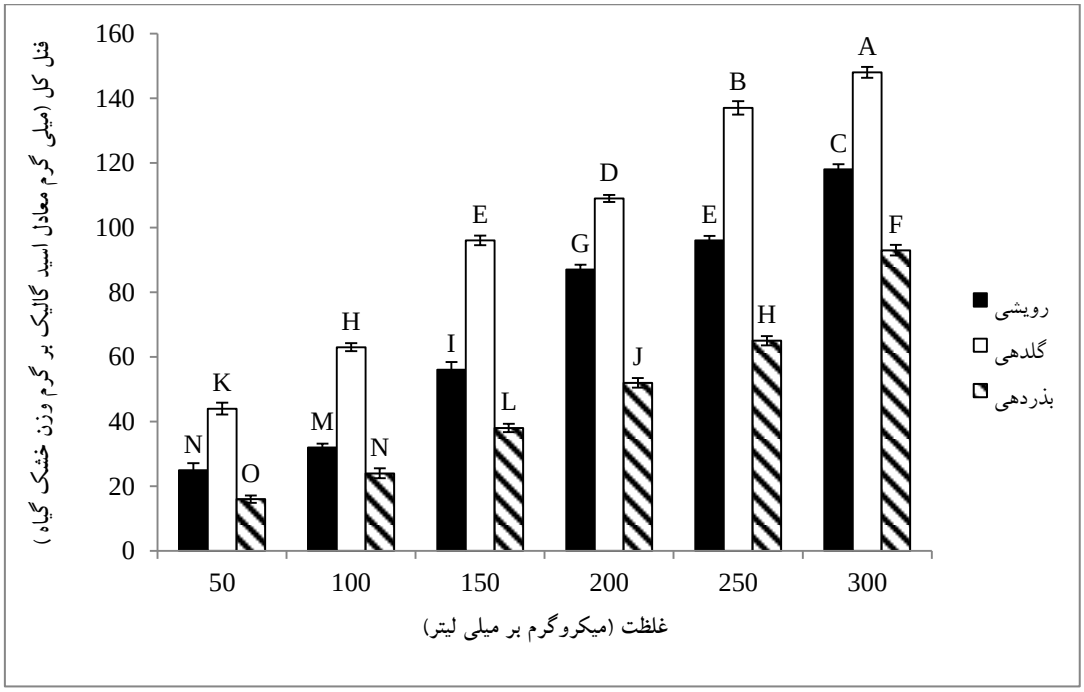
فنل کل

جدول ۱ نشان می دهد که مراحل فنولوژی گونه *D. anethifolia* بر میزان فنل کل این گیاه اثر معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). نتایج مربوط به میزان فنل کل گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی در شکل ۳ ارائه شده است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که مرحله گلدهی گونه *D. anethifolia* در تمامی غلظت‌های مورد بررسی دارای بیشترین میزان فنل کل بود و پس از آن به‌ترتیب مراحل رویشی و بذردهی گیاه قرار داشتند. بالاترین میزان فنل کل (۱/۷±۱۴۸ میلی گرم برابر اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه) در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره مرحله گلدهی گیاه اندازه‌گیری شد و کمترین میزان فنل کل (۱/۲±۱۶ میلی گرم برابر اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه) در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مرحله بذردهی گیاه مشاهده گردید.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر مراحل فنولوژی در میزان فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد التهابی گونه *Ducrosia anethifolia*

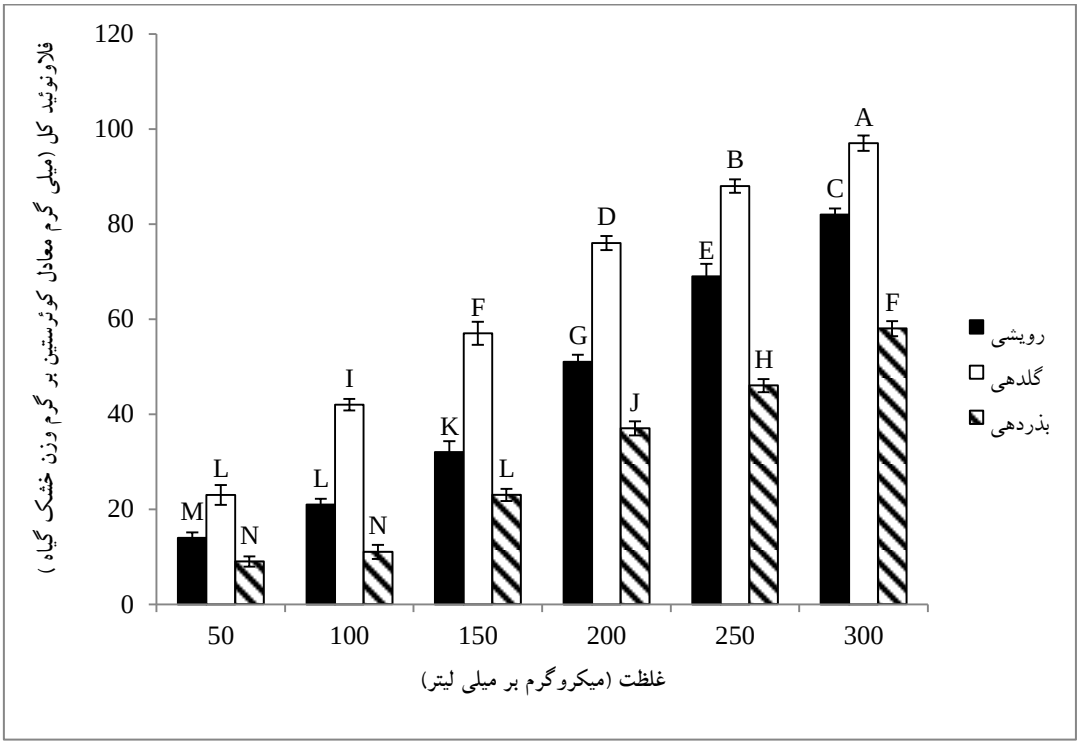
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F محاسباتی
فنل کل	۲	۲۴۱۴۱/۰۰	۱۲۰۷۰/۵۰	۱۰/۶۵*
فلاونوئید کل	۲	۹۹۶۷/۱۴	۴۹۸۳/۵۷	۸/۷۲*
فعالیت آنتی‌اکسیدانی	۲	۸۰۸۰/۳۳	۴۰۴۰/۱۶	۷/۷۳*
فعالیت ضد التهابی	۲	۶۴۴۸/۹۰	۳۲۲۴/۴۵	۱۶/۶۵*

علامت *، به مفهوم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.



شکل ۳- تأثیر مراحل مختلف فنولوژی بر محتوای فنل کل در گونه *Ducrosia anethifolia*

حروف نشان‌دهنده مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن است (P≤۰/۰۵)



شکل ۴- تأثیر مراحل مختلف فنولوژی بر محتوای فلاونوئید کل در گونه *Ducrosia anethifolia*

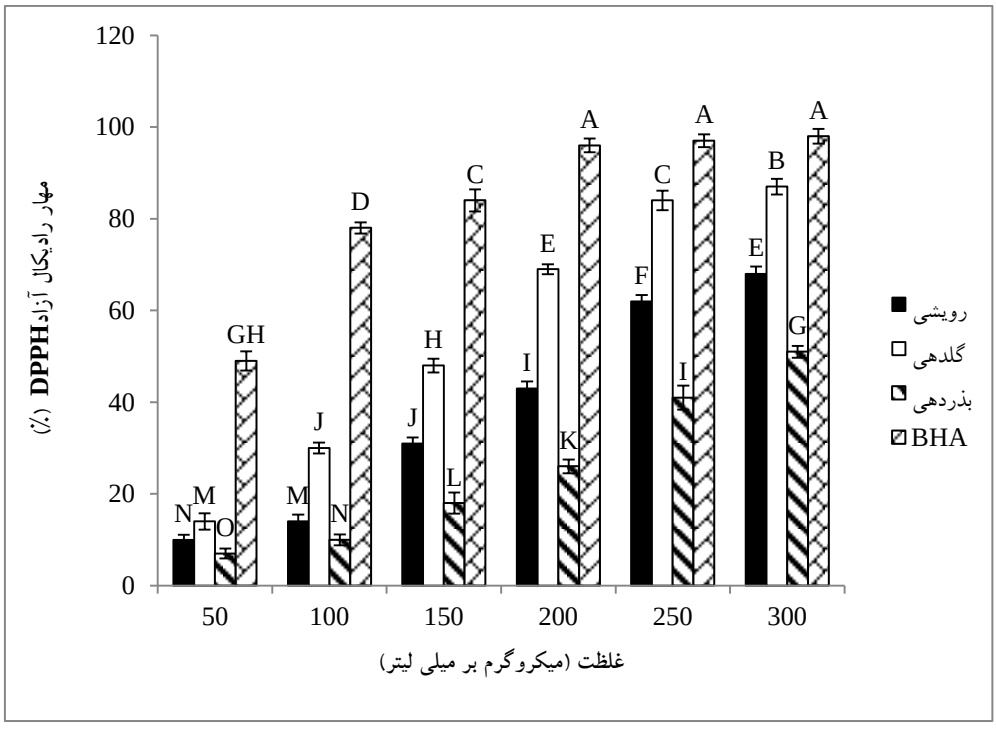
حروف نشان‌دهنده مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن است (P≤۰/۰۵)

فلاونوئید کل

نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل عصاره گونه مورد مطالعه در مراحل مختلف فنولوژی (شکل ۴) نشان داد که در مرحله گلدهی گونه مورد مطالعه میزان فلاونوئید کل به بیشترین مقدار خود افزایش یافته است و مرحله بذردهی گیاه دارای کمترین میزان فلاونوئید کل است. بیشترین میزان فلاونوئید کل (۱/۵±۹۷ میلی‌گرم برابر کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه) در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مرحله گلدهی گیاه ثبت گردید و کمترین میزان فلاونوئید کل (۱/۸±۹ میلی‌گرم برابر کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه) در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مرحله بذردهی گیاه اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج، مراحل فنولوژی گونه *D. anethifolia* با اطمینان ۹۵٪ بر میزان فلاونوئید کل این گیاه اثر معنی‌داری دارد (جدول ۱).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

براساس نتایج، مراحل فنولوژی گونه *D. anethifolia* بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن اثر معنی‌داری دارد ($P\leq ۰/۰۵$) (جدول ۱). نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی (شکل ۵) نشان داد که بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد مربوط به عصاره مرحله گلدهی و کمترین میزان آن مربوط به عصاره مرحله بذردهی گونه مورد مطالعه است. براساس نتایج در تمام مراحل فنولوژی با افزایش غلظت عصاره گیاه میزان مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. بیشترین (۱/۴±۸۷٪) و کمترین (۱/۲±۷٪) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه مورد مطالعه به‌ترتیب در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مرحله گلدهی و در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مرحله بذردهی مشاهده شد.



شکل ۵- تأثیر مراحل مختلف فنولوژی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه *Ducrosia anethifolia*

حروف نشان‌دهنده مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن است ($P\leq ۰/۰۵$)

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره گونه *Ducrosia anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی

مراحل فنولوژی	غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)			
		Staphylococcus aureus	*Bacillus cereus*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Escherichia coli*
رویشی	۵۰	۱۱/۳ ± ۰/۱ ^{Al}	۱۰/۵ ± ۰/۲ ^{Bm}	۸/۵ ± ۰/۲ ^{Ci}	۸/۱ ± ۰/۱ ^{Di}
	۱۰۰	۱۳/۲ ± ۰/۲ ^{Aj}	۱۱/۶ ± ۰/۳ ^{Bk}	۹/۶ ± ۰/۳ ^{Ch}	۹/۳ ± ۰/۲ ^{Cfg}
	۱۵۰	۱۵/۶ ± ۰/۱ ^{Ah}	۱۴/۰۰ ± ۰/۱ ^{Bi}	۱۰/۴ ± ۰/۲ ^{Cfg}	۱۰/۰۰ ± ۰/۱ ^{De}
	۲۰۰	۱۶/۳ ± ۰/۲ ^{Ag}	۱۵/۲ ± ۰/۱ ^{Bg}	۱۱/۷ ± ۰/۳ ^{Cd}	۱۰/۸ ± ۰/۳ ^{Dd}
	۲۵۰	۱۷/۴ ± ۰/۳ ^{Aef}	۱۶/۹ ± ۰/۲ ^{Ae}	۱۲/۶ ± ۰/۱ ^{Bc}	۱۱/۴ ± ۰/۲ ^{Cc}
	۳۰۰	۱۸/۶ ± ۰/۲ ^{Ac}	۱۷/۴ ± ۰/۳ ^{Bd}	۱۳/۲ ± ۰/۱ ^{Cb}	۱۲/۷ ± ۰/۱ ^{Db}
گلدهی	۵۰	۱۲/۵ ± ۰/۱ ^{Ak}	۱۱/۲ ± ۰/۱ ^{Bl}	۹/۴ ± ۰/۲ ^{Ch}	۹/۱ ± ۰/۱ ^{Cg}
	۱۰۰	۱۴/۴ ± ۰/۳ ^{Ai}	۱۳/۰۰ ± ۰/۱ ^{Bj}	۱۰/۵ ± ۰/۱ ^{Cf}	۱۰/۲ ± ۰/۲ ^{Ce}
	۱۵۰	۱۶/۲ ± ۰/۱ ^{Ag}	۱۵/۶ ± ۰/۲ ^{Bf}	۱۱/۲ ± ۰/۱ ^{Ce}	۱۰/۹ ± ۰/۳ ^{Cd}
	۲۰۰	۱۷/۶ ± ۰/۳ ^{Ae}	۱۶/۷ ± ۰/۱ ^{Be}	۱۲/۳ ± ۰/۲ ^{Cc}	۱۱/۵ ± ۰/۲ ^{Dc}
	۲۵۰	۱۸/۲ ± ۰/۲ ^{Ad}	۱۷/۸ ± ۰/۳ ^{Ac}	۱۳/۲ ± ۰/۳ ^{Bb}	۱۲/۷ ± ۰/۱ ^{Cb}
	۳۰۰	۱۹/۵ ± ۰/۲ ^{Ab}	۱۸/۶ ± ۰/۲ ^{Ba}	۱۴/۵ ± ۰/۲ ^{Ca}	۱۳/۶ ± ۰/۲ ^{Da}
بذردهی	۵۰	۱۰/۳ ± ۰/۱ ^{Am}	۹/۲ ± ۰/۱ ^{Bo}	۷/۶ ± ۰/۱ ^{Cj}	۷/۲ ± ۰/۲ ^{Dj}
	۱۰۰	۱۲/۷ ± ۰/۴ ^{Ak}	۱۰/۱ ± ۰/۲ ^{Bn}	۹/۳± ۰/۲ ^{Ch}	۸/۶ ± ۰/۱ ^{Dh}
	۱۵۰	۱۴/۴ ± ۰/۱ ^{Ai}	۱۳/۳ ± ۰/۱ ^{Bj}	۱۰/۱ ± ۰/۳ ^{Ch}	۹/۶ ± ۰/۲ ^{Cf}
	۲۰۰	۱۵/۸ ± ۰/۲ ^{Ah}	۱۴/۵ ± ۰/۱ ^{Bh}	۱۰/۵ ± ۰/۲ ^{Cf}	۱۰/۱ ± ۰/۱ ^{Ce}
	۲۵۰	۱۶/۳ ± ۰/۱ ^{Ag}	۱۵/۸ ± ۰/۳ ^{Bf}	۱۱/۵ ± ۰/۱ ^{Cde}	۱۰/۶ ± ۰/۱ ^{Dd}
	۳۰۰	۱۷/۱ ± ۰/۱ ^{Af}	۱۶/۷ ± ۰/۲ ^{Be}	۱۲/۶ ± ۰/۲ ^{Cc}	۱۱/۴ ± ۰/۲ ^{Dc}
جنتامایسین	۱۰ میکروگرم در دیسک	۲۱/۳ ± ۰/۲ ^{Aa}	۱۸/۲ ± ۰/۱ ^{Bb}	۱۴/۵ ± ۰/۲ ^{Ca}	۱۳/۴ ± ۰/۳ ^{Da}

*: حروف نشان‌دهنده مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن است (P≤۰/۰۵).

فعالیت ضد باکتریایی

روش انتشار دیسک

نتایج مربوط به فعالیت ضد باکتریایی عصاره گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*) و گرم منفی (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*) به روش انتشار دیسک در جدول ۲ ارائه شده است. براساس نتایج بیشترین قطر هاله عدم رشد برای تمام باکتری‌های مورد مطالعه در مرحله گلدهی گیاه ثبت گردید و با افزایش غلظت عصاره قطر هاله عدم رشد تشکیل شده برای تمام باکتری‌های مورد مطالعه افزایش یافت. در غلظت‌های یکسان از عصاره گیاه مورد مطالعه بیشترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری *S. aureus* و کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *E. coli* مشاهده شد. نتایج نشان داد که عصاره گونه مورد مطالعه در مراحل مختلف فنولوژی اثرگذاری بیشتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت در قیاس با باکتری‌های گرم منفی دارد.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

در جدول ۳ نتایج مربوط به حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت کشندگی عصاره گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه به روش میکرودایلوشن ارائه شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکننده از عصاره اتانولی گونه مورد مطالعه برای باکتری *S. aureus*، *B. cereus*، *P. aeruginosa* و *E. coli* به‌ترتیب برابر با ۹/۴، ۱۸/۷، ۳۷/۵ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی به‌ترتیب برابر با ۱۸/۷، ۳۷/۵، ۷۵ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مربوط به مرحله گلدهی گیاه بود.

فعالیت ضد التهابی

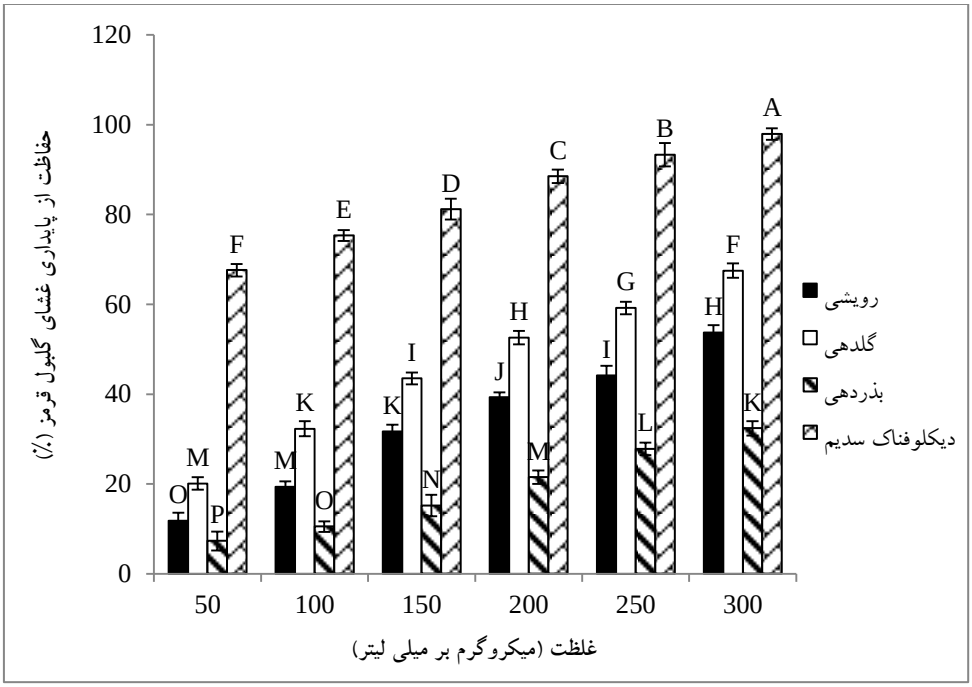
نتایج نشان‌دهنده اثر معنی‌دار مراحل فنولوژی گونه *D. anethifolia* بر فعالیت ضد التهابی آن در سطح احتمال ۵٪ بود (جدول ۱). در شکل ۶ نتایج مربوط به فعالیت ضد التهابی عصاره گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی با استفاده از روش پایداری غشای گلبول قرمز ارائه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره گیاه قدرت حفاظت از پایداری غشای گلبول قرمز افزایش یافت. بهترین نتیجه در این مطالعه در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با حفاظتی برابر با ۱/۵±۶۷/۵٪ برای عصاره مرحله گلدهی گیاه اندازه‌گیری شد. در غلظت‌های یکسان از عصاره گیاه مورد مطالعه همواره عصاره مرحله گلدهی گیاه بهترین عملکرد حفاظتی را داشت و پس از آن به‌ترتیب عصاره‌های مراحل رویشی و بذردهی گیاه قرار داشتند.

بحث

ترکیب‌های ثانویه در پاسخ به یک محرک در گیاهان تولید می‌شود و به گیاهان این توانایی را می‌دهد تا نسبت به تنش وارده واکنش نشان داده و با محیط سازگار شود. تولید و تجمع این ترکیب‌ها توسط برهم‌کنش پیچیده بین عوامل درونی گیاه و عوامل زیستی و غیر زیستی تنظیم می‌شود (Beckman, 2000). همسو با نتایج این تحقیق مطالعات متعددی نشان داده‌اند که میزان ترکیب‌های ثانویه در گیاهان بستگی به مرحله رشد و نموی گیاه دارد (Wegiera *et al*., 2011؛ Simpson *et al*., 2009؛ Jakovljević *et al*., 2013).

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره گونه *Ducrosia anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی

باکتری‌های مورد مطالعه	مراحل فنولوژی	حداقل غلظت مهار (MIC) (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (MBC) (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)
Staphylococcus aureus	رویشی	۱۸/۷	۳۷/۵
	گلدهی	۹/۴	۱۸/۷
	بذردهی	۳۷/۵	۷۵
Bacillus cereus	رویشی	۳۷/۵	۷۵
	گلدهی	۱۸/۷	۳۷/۵
	بذردهی	۳۷/۵	۷۵
Pseudomonas aeruginosa	رویشی	۷۵	۱۵۰
	گلدهی	۳۷/۵	۷۵
	بذردهی	۷۵	۱۵۰
Escherichia coli	رویشی	۱۵۰	۳۰۰
	گلدهی	۷۵	۱۵۰
	بذردهی	۱۵۰	۳۰۰



شکل ۶- تأثیر مراحل مختلف فنولوژی بر میزان فعالیت ضد التهابی گونه *Ducrosia anethifolia*

حروف نشان‌دهنده مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن است (P≤۰/۰۵)

از سوی دیگر شرایط محیطی مانند دما و تابش نور خورشید بر میزان ترکیب‌های ثانویه گیاهان تأثیر به‌سزایی دارند، به‌طوری که افزایش دما باعث تجمع این ترکیب‌ها در گیاهان می‌شود و نور نیز از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌ها به‌ویژه آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز بر بیوسنتز این ترکیب‌ها اثر گذاشته و باعث افزایش این ترکیب‌ها در گیاهان می‌شود (Smith, 1973). در این مطالعه نیز از آنجایی‌که مرحله گلدهی و رویشی گیاه مصادف با شدت نور بیشتر و دمای بالاتر در طبیعت (خرداد ماه) بود، می‌توان بیشتر بودن میزان ترکیب‌های ثانویه (فنل کل و فلاونوئید کل) در این مراحل از رشد گیاه را به این موضوع نسبت داد.

نتایج بدست آمده از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی نشان داد که این گونه از توانایی مناسبی برای حذف رادیکال های آزاد DPPH برخوردار است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی عمدتاً به‌دلیل وجود ترکیب‌های شیمیایی گیاهی مانند پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها است که توانایی جذب و خنثی کردن گونه‌های اکسیژن فعال را دارند. براساس مطالعات میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهان با میزان ترکیب‌های پلی‌فنلی موجود آنها رابطه مستقیم دارد (Bai *et al*., 2010؛ Arumugam *et al*., 2010؛ Cheung & Tai, 2007). در این مطالعه عصاره‌های گیاه مورد مطالعه در غلظت‌های بالاتر به‌دلیل داشتن میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی بیشتر، از توانایی بالاتری در مهار رادیکال آزاد DPPH برخوردار بودند. براساس مطالعات در طول رشد گیاه فرایندهای سنتز و تخریب ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند انجام شود که این امر منجر به تغییر در توانایی آنتی‌اکسیدانی گیاهان در مراحل مختلف فنولوژی می‌شود (Chouaieb *et al*., 2012). در توافق با نتایج این تحقیق مطالعات متعددی نشان داده‌اند که گیاهان در مراحل مختلف فنولوژی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی برخوردارند. Jakovljević و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه *Chelidonium majus* L. بستگی به مرحله فنولوژی آن دارد. آنان همچنین بیان کردند که گونه مذکور در مرحله گلدهی دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. Alizadeh (۲۰۱۵) بیان کرد که عصاره بدست‌آمده در مرحله گلدهی کامل گونه *Satureja rechingeri* در مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به دیگر مراحل فنولوژی آن مؤثرتر است. Khodabande و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه *Chelidonium majus* در مراحل مختلف فنولوژی بیان کردند که مرحله رشد رویشی آن از بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخوردار است و می‌تواند محافظت قابل توجهی در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد کند. Moghaddam و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه *Fumaria vaillantii* پرداختند. نتایج آنان نشان داد که عصاره مرحله رشد رویشی گیاه دارای حداکثر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود و با پیشرفت مراحل رشد گیاه میزان آن کاهش یافت.

یکی از خصوصیات مهم عصاره‌های گیاهی مربوط به ویژگی آب‌گریزی آنهاست که عصاره‌ها را قادر می‌سازد تا با لایه لیپیدی غشای سلولی باکتری‌ها پیوند برقرار کرده و باعث پاره شدن غشای سلولی و در نتیجه خروج مولکول‌ها و یون‌های مهم باکتری‌ها به خارج از سلول شده و در نهایت منجر به مرگ باکتری شوند (Joshi & Lekhak, 2009). ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاهان با ایجاد تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی باکتری‌ها، تغییر در عملکردهای مختلف درون سلولی (ناشی از اتصال هیدروژنی ترکیبات فنلی به آنزیم‌ها) یا با تغییر در استحکام دیواره سلولی (به دلیل برهم‌کنش‌های مختلف با غشای سلولی) اثرهای ضد باکتریایی خود را اعمال می‌کنند (Cushnie & Lamb, 2011). همسو با نتایج این مطالعه مطالعات متعددی نشان داده‌اند که با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی افزایش می‌یابد. Amjad و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که میزان فعالیت ضد

باکتریایی عصاره گیاه بومادران با غلظت عصاره مورد استفاده ارتباط مستقیم دارد. همچنین Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۲) نیز بیان کردند که فعالیت ضد باکتریایی عصاره بلوط ایرانی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقابل عصاره‌های گیاهی می‌تواند به‌دلیل یک لایه بودن دیواره سلولی این باکتری‌ها باشد و این در حالی است که باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره سلولی چند لایه هستند. به بیان دیگر در باکتری‌های گرم منفی یک غشای بیرونی و یک فضای پری‌پلاسمیک وجود دارد، در صورتی که باکتری‌های گرم مثبت فاقد آنها هستند. غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند سدی محکم از نفوذ مولکول‌های آنتی‌بیوتیک جلوگیری می‌نماید. از سوی دیگر این غشاء از عبور مولکول‌های بزرگ و آب‌گریز جلوگیری می‌کند و از آنجایی‌که بیشتر ترکیب‌های مؤثر موجود در عصاره‌ها ماهیت آب‌گریزی دارند، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این مواد نمی‌توانند به نقاط فعال داخل باکتری نفوذ و دسترسی پیدا کرده و به‌همین دلیل معمولاً باکتری‌های گرم منفی در قیاس با باکتری‌های گرم مثبت از مقاومت بیشتری در مقابل ترکیب‌های گیاهی برخوردارند (Mckeegan *et al*., 2002). از سوی دیگر فضای پری‌پلاسمیک در باکتری‌های گرم منفی دارای آنزیم‌های محافظت‌کننده زیادی است که توانایی تجزیه مولکول‌های خارجی وارد شده را دارند (Khamis & Chai, 2021).

ناپایداری غشای لیزوزوم‌ها یکی از عواملی است که باعث پیشرفت شرایط التهابی می‌گردد (Jardim, 2005). پایداری غشای لیزوزومی باعث محدود شدن پاسخ التهابی می‌گردد و این موضوع از طریق جلوگیری از آزاد شدن محصولات نوتروفیلی فعال از قبیل آنزیم‌های باکتریایی و پروتئینازی انجام می‌شود. تأثیرگذاری داروهای غیراستروئیدی ضد التهاب نیز از طریق مهار آنزیم‌های لیزوزومی و یا پایداری غشای لیزوزومی انجام می‌شود (Heimer & Alheid, 1991). از آنجایی که غشای گلبول‌های قرمز به غشای لیزوزومی شباهت زیادی دارد (Bag *et al*., 2013)، در این مطالعه بررسی پایداری غشای گلبول‌های قرمز انسانی برای مطالعه فعالیت ضدالتهابی عصاره گونه *D. anethifolia* مورد استفاده قرار گرفت. هنگامی که گلبول قرمز انسان تحت استرس هیپوتونیک است می‌توان با استفاده از عوامل ضد التهابی و تثبیت غشاء توسط آن از انتشار هموگلوبین از گلبول قرمز جلوگیری کرد (Shailesh *et al*., 2011). در این مطالعه با افزایش محتوای ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی اثرهای حفاظتی و ضد التهابی عصاره‌ها افزایش یافت. همسو با نتایج این تحقیق مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بین میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی و اثرهای ضد التهابی رابطه مستقیم وجود دارد (Ambriz-Pérez *et al*., 2016؛ de la Lastra & Villegas, 2005).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که مطالعه تغییرات ترکیب‌های ثانویه مهم (فنل کل و فلاونوئید کل) در گونه *D. anethifolia* در مراحل مختلف فنولوژی نشان داده که میزان این ترکیب‌ها تا مرحله گلدهی گیاه افزایش و در مرحله بذردهی کاهش می‌یابد. بنابراین مناسب‌ترین زمان برای بهره‌برداری از گیاه مورد مطالعه با هدف دستیابی به بالاترین میزان ترکیب‌های ثانویه مرحله گلدهی گیاه است. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گونه *D. anethifolia* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی است و می‌توان آن را به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های ساختگی در صنایع غذایی و دارویی در نظر گرفت. براساس نتایج بدست‌آمده عصاره گونه *D. anethifolia* اثرهای ضد باکتریایی مناسبی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه دارد. بنابراین می‌توان آن را به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی با عوارض کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد توجه قرار داد. همچنین عصاره گونه مورد مطالعه دارای اثرهای ضد التهابی مناسبی بود و حداکثر فعالیت ضد التهابی آن در مرحله گلدهی گیاه و همزمان با وجود

حداکثر ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی مشاهده شد. بنابراین عصاره این گیاه و به‌طور خاص عصاره مرحله گلدهی آن می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسبی برای ساخت داروهای ضدالتهاب طبیعی مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است (شماره گرنت: IR-UOZ-GR 9186). از دست‌اندرکاران و حمایت‌کنندگان قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Alizadeh, A., 2015. Essential oil composition, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activity of cultivated *Satureja rechingeri* Jamzad at different phenological stages. Zeitschrift für Naturforschung C, 70: 51-58.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D.G. and Lightfoot, D.A., 2017. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. Plants, 6(4): 42.
- Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E.P. and Heredia, J.B., 2016. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. a Review. Cogent Food & Agriculture, 2(1): 162-171.
- Amjad, L., Mohammadi Kamalabadi, M. and Mohammadi Sichani, M., 2011. Antibacterial activity of methanol extract of *Achillea wilhe lmsii* C. Koch flower and leaf. Qom University of Medical Sciences Journal, 5(3): 50-56.
- Arumugam, P., Ramamurthy, P. and Ramesh, A., 2010. Antioxidant and cytotoxic activities of lipophilic and hydrophilic fractions of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae). International Journal of Food Properties, 13(1): 23-31.
- Bag, A., Kumar Bhattacharyya, S., Kumar Pal, N. and Ranjan Chattopadhyay, R., 2013. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. Pharmaceutical Biology, 51: 1515-1520.
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.S., Shao, X., Pan, M.H. and Ho, C.T., 2010. Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(9): 5363-5367.
- Beckman, C.H., 2000. Phenolic storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? Physiological and Molecular Plant Pathology, 57: 101-110.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10: 178-182.
- Cheung, S. and Tai, J., 2007. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. Oncology Reports, 17: 1525-1531.
- Chouaieb, H., Ayadi, I., Zouari, S., Fakhfakh, N., Zaidi, S. and Zouari, N., 2012. Effect of phenological stage and geographical location on antioxidant activities of tunisian horehound: *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). Journal of Biologically Active Products from Nature, 2(4): 232-238.
- Das, K., Tiwari, R.K.S. and Shrivastava, D.K., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research, 4(2): 104-111.
- de la Lastra, C.A. and Villegas, I., 2005. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. Molecular Nutrition & Food Research, 49(5): 405-430.
- Ebrahimi, A., Khayami, M. and Nejati, V., 2012. Comparison of Antimicrobial effect of different parts of *Quercus persica* against Escherichia coli O157:H7. Horizon of Medical Sciences, 17(4):11-17.
- Górniak, I., Bartoszewski, R. and Króliczewski, J., 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. Phytochemistry Reviews, 18(1): 241-272.

and antioxidant activity of *Fumaria vaillantii* extract at three phenological stages assayed by various methods. International Journal of Horticultural Science and Technology, 5(1): 93-102.
- Mottaghipisheh, J., Maghsoudlou, M.T., Valizadeh, J. and Arjomandi, R., 2014. Antioxidant activity and chemical composition of the essential oil of *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss. from Neyriz. Journal of Medicinal plants and By-Product, 3(2): 215-218.
- Mottaghipisheh, J., Nové, M., Spengler, G., Kúsz, N., Hohmann, J. and Csupor, D., 2018. Antiproliferative and cytotoxic activities of furocoumarins of *Ducrosia anethifolia*. Pharmaceutical Biology, 56: 658-664.
- MyungJin, C., Yohannes, S.B., Damte, D., Reza, M. and TaeHan, K., 2012. The in vitro antibacterial activity of enrofloxacin trimethoprim combination against five bacterial species. Pakistan Veterinary Journal, 32(3): 363-366.
- Nisar, B., Sultan, A. and Rubab, S.L., 2018. Comparison of medicinally important natural products versus synthetic drugs-a short commentary. Natural Products Chemistry and Research, 6(2): 308.
- Nunes, C.D.R., Barreto Arantes, M., Menezes de Faria Pereira, S., Leandro da Cruz, L., de Souza Passos, M., Pereira de Moraes, L., Vieira, I.J.C. and de Oliveira, D.E., 2020. Plants as sources of anti-inflammatory agents. Molecules, 25(16): 3726.
- Rankovič, B., Rankovic, D. and Maric, D., 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. Microbiology, 79(6): 809-815.
- Rojas, J.J., Ochoa, V.J., Ocampo, S.A. and Muñoz, J.F., 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. BMC Complementary Medicine and Therapies, 6(1): 1-6.
- Shahid, M., Shahzad, A., Sobia, F., Sahai, A., Tripathi, T., Singh, A. and Khan, H.M., 2009. Plant natural products as a potential source for antibacterial agents: recent trends. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 8(3): 211-225.
- Haghi, G., Safaei, A. and Safari, J., 2004. Extraction and determination of the main components of the essential oil of *Ducrosia anethifolia* by GC and GC/MS. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3(2): 90-91.
- Heimer, L. and Alheid, G.F., 1991. Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. Advances in Experimental Medicine and Biology, 295: 1-42.
- Hoodgar, F., Nasri, S. and Amin, G., 2011. Investigation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydro-alcoholic extract of *Securigera securidaca*. Horizon of Medical Sciences, 17(1): 12-19.
- Jakovljević, D.Z., Stanković, S.M. and Topuzović, D.M., 2013. Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. EXCLI Journal, 12: 260-268.
- Jardim, M.C., 2005. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 82(1): 182-189.
- Joshi, B. and Lekhak, S., 2009. Antibacterial property of different medicinal plants. Journal of Science Engineering and Technology, 5: 143-150.
- Khamis, A.D.S. and Chai, L.C., 2021. Chemical and antimicrobial analyses of *Juniperus chinensis* and *Juniperus seravschanica* essential oils and comparison with their methanolic crude extracts. International Journal of Analytical Chemistry, 2021: 1-8.
- Khodabande, Z., Jafarian, V. and Sariri, R., 2017. Antioxidant activity of *Chelidonium majus* extract at phenological stages. Applied Biological Chemistry, 60(5): 497-503.
- Mckeegan, K.S., Borges Walmsley, M.I. and Walmsley, A.R., 2002. Microbial and viral drug resistance mechanisms. Trends in Microbiology, 10(10): S8-S14.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and pralin contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. Food Chemistry, 91: 571-577.
- Moghaddam, M., Khaleghi Miran, S.N. and Mehdizadeh, L., 2018. Total phenolic content

methylascochlorin. The Journal of Antibiotics, 60(1): 20-26.
- Vane, J.R. and Botting, R.M., 1995. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. Inflammation Research, 44(1): 1-10.
- Wegiera, M., Grabarczyk, P., Baraniak, B. and Smolarz, H.D., 2011. Antiradical properties of extracts from roots, leaves and fruits of six *Rumex* L. species. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 53(1): 125-131.
- Weli, A.M., Al-Salmi, S., Al Hoqani, H. and Hossain, M.A., 2018. Biological and phytochemical studies of different leaves extracts of *Pteropyrum scoparium*. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 7(4): 481-486.
- Wintola, O.A. and Afolayan, A.J., 2015. The antibacterial, phytochemicals and antioxidants evaluation of the root extracts of *Hydnora africana* Thunb. used as antidysenteric in Eastern Cape Province, South Africa. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15(1): 1-12.
- Zhivich, A., 2017. Fighting bacterial resistance: Approaches, challenges, and opportunities in the search for new antibiotics. Part 1. Antibiotics used in clinical practice: Mechanisms of action and the development of bacterial resistance. Microbiology Independent Research journal, 4(1): 31-51.
- Shailesh, G., Seema, K. and Dwivedi, S., 2011. In-vitro anti-inflammatory activity of *Sarcostemma acidum* Wight. & Arn. Indian herb by Human red blood cell membrane stabilization method. International Journal of Pharmacy Teaching & Practices, 2: 184-188.
- Sharifi-Rad, M., Epifano, F., Fiorito, S. and Álvarez-Suarez, J.M., 2020. Phytochemical analysis and biological investigation of *Nepeta juncea* Benth. different extracts. Plants, 9(5): 646.
- Simpson, T.S., Savage, G.P., Sherlock, R. and Vanhanen, L.P., 2009. Oxalate content of silver beet leaves (*Beta vulgaris* var. cicla) at different stages of maturation and the effect of cooking with different milk sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(22): 10804-10808.
- Smith, H., 1973. Regulatory mechanisms in the photocontrol of flavonoid biosynthesis: 303-320. In: Milborrow, B.V., (Ed.). Biosynthesis and Its Control in Plants. New York, Academic Press, 364p.
- Stavri, M., Mathew, K.T., Bucar, F. and Gibbons, S., 2003. Pangelin, an antimycobacterial coumarin from *Ducrosia anethifolia*. Planta Medica, 69(10): 956-959.
- Toyang, N.J. and Verpoorte, R., 2013. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, 146(3): 681-723.
- Tsuruga, M., Nakajima, H. and Magae, J., 2007. Immunosuppressive activity of 4-O-

Evaluation of phytochemical, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory properties of Moshgak (*Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss.) at different phenological stages

M. Sharifi-Rad[1*]

1*- Corresponding author, Department of Range and Watershed Management, Faculty of Water and Soil, University of Zabol, Zabol, Iran, E-mail: Majidsharifirad@uoz.ac.ir

Received: September 2021 Revised: November 2021 Accepted: December 2021

Abstract

Ducrosia anethifolia (DC.) Boiss. is one of the medicinal plants belonging to the fam. apiaceae that has been recommended as a treatment for the neurological disorders. The present study was aimed at investigating the changes in the phytochemicals content and the antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties of *D. anethifolia* ethanolic extract at the different phenological stages (vegetative, flowering, and seeding). The plant shoots were collected at each stage randomly. The total phenols and flavonoids contents of the ethanolic extracts were measured using the spectrophotometry method and the antioxidant activity was determined by the DPPH free radical scavenging method. The disk diffusion method was used to investigate the antibacterial activity of the plant extract against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. Also, the anti-inflammatory activity of the plant extract was assessed using the human red blood cell stabilization method. The results showed that there was a significant difference between the different phenological stages in terms of the total phenols and flavonoids contents and the antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties (P <0.05). The highest amount of total phenols and flavonoids (148 ± 1.7 mg Gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight and 97 ± 1.5 mg Quercetin equivalents (QE)/g dry weight, respectively) and antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities was observed at the flowering stage. The results also showed that the plant extract studied had a greater inhibitory effect on the Gram-positive bacteria than the Gram-negative ones. The results indicated that the ethanolic extract of *D. anethifolia* could be used as a promising agent with the antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties to treat many diseases. Also, the flowering stage could be introduced as the best harvest time for the medicinal use of this species.

Keywords: Antioxidant activity, antibacterial activity, anti-inflammatory activity, *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss., phenology.