بررسی اکوفیتوشیمیایی، اتنوفارماکولوژی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی عصاره اندام‌های مختلف گیاه دارویی *Melilotus officinalis* L. در رویشگاه کوهستانی چهارباغ – استان سمنان

گلاره برهانی[۱]، معصومه مازندرانی[۲*]، حسین عباسپور[۳]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

[۲]دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

[۳]دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۷

چکیده

گیاه دارویی یونجه زرد با نام علمی *M.elilotus officinalis* L. متعلق به تیره باقلا (Fabaceae) است که در طب سنتی به عنوان مقوی، ضد عفونی کننده و تنظیم کننده قند خون، ضد نفخ و مرحم در التیام زخم‌های پوستی و پای دیابتی مصرف می‌شود. در این تحقیق ضمن عملیات صحرایی فراوان، مهم‌ترین اطلاعات دارویی در مورد مصارف سنتی گیاه از درمان‌گران محلی اخذ گردید؛ سپس مهمترین نیازهای اکولوژیکی و اندام‌های مختلف گیاه (سرشاخه‌های گلدار، ساقه و ریشه) در اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ از رویشگاه ۲۳۰۰ متری کوهستان باغ جمع آوری گردید؛ عصاره‌های آبی و اتانولی با استفاده از روش خیساندن استخراج و به‌منظور انجام تست‌های فیتوشیمیایی از روش های اسپکتروفوتومتری و برای ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی از روش‌های DPPH, TAC, RP استفاده شد. عملکرد ضدباکتریایی عصاره اتانولی اندام‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و MIC بررسی گردید. نتایج بررسی میدانی نشان داد که مردم این منطقه بیشتر از سرشاخه‌های گلدار گیاه به عنوان مقوی، ضد التهاب و ضدعفونی کننده در درمان التهاب مفاصل ، زخم‌های دیابتی و رقیق کننده خون استفاده می‌کنند. عصاره اتانولی سرشاخه‌های گلدار گیاه ضمن اینکه از بیشترین میزان فنول کل (۰/۱۳ ± ۳۸/۰۸ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در هر گرم وزن خشک گیاه)، فلاونویید کل (۰/۰۱ ±۶۲/٤ میلی گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن خشک گیاه) برخوردار بودند، در تست DPPH نیز از بیشترین میزان عملکرد آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال‌های آزاد با میزان IC50=۱۰/۶۱ برخوردارند و به‌ترتیب باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococus aureus*، *Staphylococus epidermidis*، *Bacilus cereus* و *Entrococus faecalis* از بیشترین حساسیت نسبت به عصاره اتانولی گلها نشان داد. تحلیل داده‌ها نشان از آن است که عملاً یک رابطه مستقیم و معنی‌دار بین نوع اندام گیاه، نوع حلال، متابولیت‌های ثانویه و عملکرد دارویی آن وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنتی باکتریال، اتنوفارماکولوژی، اندام‌های مختلف، چهارباغ، فنول، فلاونویید، یونجه زرد

*نویسنده مسئول: mazandarani.m@gorganiau.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه فرهنگ استفاده از فراورده‌های طبیعی موثر و کم خطر از منابع گیاهی آنتی اکسیدان به عنوان یک راه سیستماتیک که دارای ارزش استراتژی و اقتصادی در سطح جهان است، اهمیت خاصی پیدا کرده است. از آنجایی که گیاهان دارویی بومی در رویشگاه‌های طبیعی از تنوع بالای متابولیت‌های دارویی برخوردارند و سابقه دیرینه در درمان دارند، یکی از منابع غنی دارویی در کشور محسوب می‌شوند که انجام مطالعات فیتوشیمیایی، اکولوژیکی و اتنوفارماکولوژی آنها به‌منظور دست‌یابی به فراورده‌های دارویی طبیعی در بحث پیشگیری و درمان را صد چندان ضروری می‌سازد (Mazandarani et al., 2013).

گیاه دارویی یونجه زرد. *Melilotus officinalis* به‌صورت خودرو در اغلب مناطق مدیترانه ای و ایران و تورانی اروپا، آسیا یافت می‌شود (Ghasemi et al., 2013; Hirakawa et al., 2000) این گیاه در بردارنده ترکیبات شیمیایی کومارین، آلکالوئید، ترپنوئید، گلیکوزید، فنل، فلاونوئید و اسیدهای چرب است که در ریشه، ساقه و سرشاخه گلدار گیاه یافت می‌شود (Stefanovic et al., 2015). در طب سنتی اغلب کشورهای باستان مثل مصر، از دمنوش آن به عنوان ضد التهاب و ضد انگل یا به‌صورت پماد در درمان مفاصل ملتهب و التیام زخم مصرف می‌شد، هم اکنون نیز در انگلستان و آلمان استفاده از فراورده‌های دارویی این گیاه در درمان مشکلات عروقی و لخته شدن خون و زخم‌ها تایید کرده است (Grossberg and Fox, 2007; Ran et al., 2008; Plesca-Manea et al., 2002). در اروپا نیز علاوه بر استفاده‌های دارویی فوق، به‌عنوان مقوی، مسکن، ضدالتهاب و ضدعفونی کننده قوی در التیام زخم‌های سوختگی و زخم پای دیابتی از گیاه از خشک شده گیاه در حفاظت از لباس‌ها و پارچه‌های کتان قرار می‌دادند تا مانند اسطوخدوس از آن‌ها در مقابل بیدزدگی محافظت کند (Chorepsima et al., 2013). قاسمی و همکاران و چایب و همکاران (Ghasemi et al., 2011; Chaeieb et al., 2011) در تحقیقات مختلف فیتوشیمیایی بیشتر خواص دارویی این گیاه را به ترکیبات ثانوی فنولی، فلاونویید و کومارین گیاه نسبت داده اند. لذا از آنجایی که این گیاه از مهم‌ترین گونه‌های دارویی شمال ایران است و مردم بومی منطقه از آن به عنوان یک داروی ضد التهاب، ضدعفونی کننده در درمان زخم و التهاب پای دیابتی، التهاب مفاصل و زخم‌ها استفاده می‌کنند، این تحقیق به بررسی و مقایسه اثرات مختلف عصاره آبی و اتانولی این گیاه پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

شناسایی و جمع‌آوری: در عملیات صحرایی فراوان در منطقه کوهستانی چهارباغ واقع دز جنوب شرق استان سمنان در سال ۱۳۹۵ ضمن شناسایی رویشگاه‌های طبیعی گیاه مهمترین نیازهای اکولوژیکی، گونه‌های همراه و فنولوژی گیاه بهمراه اخذ اطلاعات محلی در مورد نحوه استفاده دارویی گیاه ثبت گردید. اندام‌های مختلف گیاه (ریشه، ساقه، سرشاخه) از منطقه کوهستانی چهارباغ- ۲۳۰۰ متر (استان گلستان) جمع‌آوری، در شرایط آزمایشگاهی خشک و سپس پودر آن برای انجام عملیات عصاره گیری آماده شد.

ارزیابی میزان فلاونوئید کل: به یک گرم از پودر خشک گیاه، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد (۸۰ میلی‌لیتر اتانول به حجم ۱۰۰ با آب مقطر) افزوده و به‌مدت ۲٤ ساعت بر روی shaker تکان می‌دهیم و سپس عصاره را از کاغذ صافی عبور می‌دهیم. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی (اتانولی ۸۰ درصد) گیاه، ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد و سپس ۰/۱

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۰/۱ درصد)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۰/۱ درصد) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و آنها را بخوبی هم می‌زنیم. سپس جذب آن در طول موج ٤١٥ nm قرائت گردید. منحنی استاندارد بر اساس محلول با غلظت‌های متفاوت (٥٥٠ mg/ml – ٤٥٠–٣٥٠–٢٥٠–١٥٠–٥٠) کوئرستین رسم شده و میزان فلاونوئید معادل میلی گرم کوئرستین در هر گرم پودر خشک گیاه محاسبه و تعیین گردید($mgQuEg^{-1}$). ضمناً بلانک محلول نیز به همین صورت و بدون عصاره آماده شد (Pourmorad et al., 2006).

$$A=0/001X+0/068$$

A: جذب

X: غلظت

ارزیابی میزان فنول کل: طبق عصاره‌گیری روش توتال فنل از عصاره هیدروالکلی بالا برای ارزیابی مقادیر از Folin ciocalte استفاده گردید. ابتدا به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر یک از استانداردها و عصاره‌ها، ٥ میلی‌لیتر فولین سیکاتو(۱:۱۰) و ٤ میلی‌لیتر Na_2Co_3 یک مولار اضافه گردید سپس بعد از ١٥ دقیقه جذب در ٧٦٥ نانومتر اندازه‌گیری شد و منحنی استاندارد بر حسب گالیک اسید با غلظت‌های ١٠، ٥٠، ١٠٠، ١٥٠، ٢٠٠، ٢٥٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ترسیم و میزان ترکیبات فنل گیاه معادل گالیک اسید در هر یک گرم پودر خشک گیاه اندازه‌گیری شد ($mgGAEg^{-1}$) (Pourmorad et al., 2006).

$$A=0/004X+0/1$$

A: جذب

X: غلظت

تهیه عصاره‌های آبی و هیدروالکلی با اتانول به منظور انجام تست آنتی‌اکسیدان به سه روش DPPH، RP و TAC

ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش DPPH: به یک گرم از پودر خشک گیاه با ١٠ میلی‌لیتر حلال (٦٠ میلی‌لیتر اتانول + ٤٠ میلی‌لیتر آب مقطر، ٢ میلی‌لیتر اسید استیک خالص)افزوده بعد از مدت ١٠ دقیقه صاف و دوباره ١٠ میلی‌لیتر حلال به آن افزوده و مجددا صاف می‌کنیم. محلول‌های صاف شده را روی هم ریخته به حجم ٢٥ میلی‌لیتر با حلال می‌رسانیم. ٠/٥ میلی‌لیتر عصاره اتانولی را با ٤ میلی‌لیتر بافر Tris-Hcl ١٠٠ میلی مولار که با ٥ میلی‌لیتر، DPPH (٠/٥٠٠ میکرومولار در اتانول) مخلوط کردیم اضافه می‌کنیم و سپس با بافر به حجم ١٠ میلی‌لیتر می‌رسانیم. نمونه کنترل با روش مشابه با اضافه کردن ٠/٥ میلی‌لیتر آب مقطر به جای عصاره به همراه ٢ میلی‌لیتر DPPH، ٤/٥ میلی‌لیتر بافر مخلوط کرده و با اتانول به حجم ١٠ میلی‌لیتر می‌رسانیم. محلول را خوب تکان داده، ٣٠ دقیقه می‌گذاریم بماند. جذب محلول بدست آمده (A) را در طول موج ٥١٧ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده می‌شود (Meena et al.,2012).

بلانک، محلول با ١ میلی‌لیتر عصاره و ٩ میلی‌لیتر بافر و بدون DPPH و با اتانول به حجم ١٠ میلی‌لیتر استفاده می‌شود.بلانک کنترل نیز به همین صورت و به جای عصاره از آب مقطر استفاده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از فرمول زیر بدست می‌آید:

$$\frac{(517nm)A \text{ نمونه}}{(517nm)A \text{ کنترل}} \times AA(\%)$$

ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش TAC: یک گرم از پودر خشک شده گیاه، با ١٠ میلی‌لیتر اتانول ٨٠ درصد مخلوط شده و به‌مدت ٢٤ ساعت روی شیکر قرار گرفته و سپس از کاغذ صافی عبور می‌کند. در مرحله بعد غلظت‌های مختلف از عصاره ١٢/٥–٢٥–٥٠–١٠٠–٢٥٠–٥٠٠–٧٥٠–١٠٠٠ آماده شدند. سپس ١ سی‌سی از عصاره‌های اندام‌های مختلف برداشته و به هرکدام ٣ سی‌سی معرف TAC اضافه شدند و سر لوله‌ها را با فویل بسته و به مدت ١ ساعت و نیم در بن ماری ٩٥

Archive of SID

www.SID.ir

درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از سرد شدن، جذب نمونه‌ها را در طول موج ٦٩٥ نانومتر نسبت به شاهد (۰/۳ سی‌سی متانول، ۳ سی‌سی معرف TAC) توسط دستگاه خوانده شد. ۱۵/۹۸۵ سی‌سی از اسید سولفوریک ۰/٦ مولار با آب مقطر به حجم ۵۰۰ سی‌سی رسانده و هم زده شد. در مرحله دوم ۱/۲۳۵ گرم، آمونیوم مولیبدات را به ۱۰۰ سی‌سی اسید سوافوریک ۰/٦ مولار در بشر اضافه کرده و در بشر دیگر، ۲/٦٦ گرم از تری فسفات سدیم ریخته و ۱۰۰ سی‌سی اسید سولفوریک ۰/٦ مولار اضافه کرده و در انتها با مخلوط کردن محتویات این دو بشر معرف TAC به دست می‌آید (Prieto et al., 1999).

ارزیابی فعالیت آنتی باکتریالی عصاره اتانولی نمونه‌ها: برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌ها از روش دیسک کاغذی (Disc fusion assay) با استفاده از اندازه‌گیری هاله عدم رشد، استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها روی محیط (Nutrient Agar Socrurose) NAS کشت داده شد. دیسک‌ها (به قطر ٦ میلی‌متر) با ٤۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌ها آغشته گردید و روی محیط مورد نظر قرار داده شدند. آنتی‌بیوتیک استاندارد مثل تتراسایکلین (به صورت دیسک آماده با دز۳۰) به عنوان کنترل مثبت برای تعیین هر گونه میکروب مورد آزمایش، قرار گرفته شدند؛ و همچنین دیسک‌های آغشته به حلال به عنوان کنترل منفی روی محیط قرار داده شدند. پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون در ۲۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد را از پشت پلیت باکولیس دیجیتال اندازه‌گیری کرده و نتایج حاصله به منظور مقایسه رقت‌های مختلف ثبت گردید. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد و نتایج با مقایسه میانگین آزمون‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد (P> ۰/۰۱) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS نسخه ۹،۱ و Excel انجام گرفت.

نتایج

یافته‌های بررسی‌های میدانی در این تحقیق نشان داد که رشد رویشی گیاه در رویشگاه چهار باغ از اواسط اردیبهشت جوانه‌زنی گیاه شروع و تا اوایل خرداد و در اواسط خرداد وارد فاز گلدهی و در اوایل مرداد ماه به میوه و سپس خزان می‌کند. تیپ غالب گونه‌های همراه به‌ترتیب متعلق به تیره‌های Asteraceae، Fabaceae و Lamiaceae است.

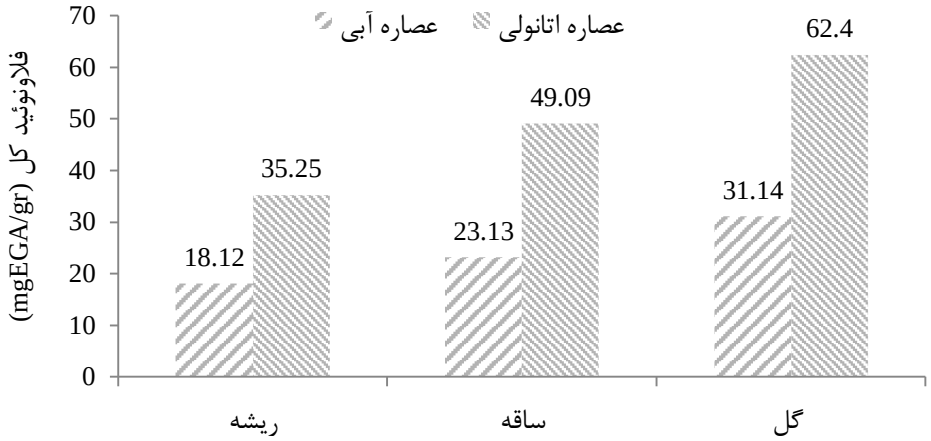
عملیات صحرایی در رویشگاه کوهستانی و خشک منطقه چهارباغ نشان می‌دهد که این گیاه بسیار مقاوم به تنش‌های مختلف است و درخاک‌های شنی و رسی و لای، رشد می‌کند.

بنا به اظهار مردم محلی این گیاه به همراه موره (*Artemisia anuua*)، درمنه (*Artemisia herba alba*) و برازمبل (*Proveskia abrotanoides*) به عنوان ضد التهاب و مسکن درد استفاده می‌شود. نتایج فیتوشیمیایی نیز نشان داد که عصاره اتانولی سرشاخه گلدار گیاه بیشترین میزان فنول کل (۰/۱۳ ± ۳۸/۰۸ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در هر گرم وزن خشک گیاه)، فلاونویید کل (۰/۰۱±٦۲/٤ میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن خشک گیاه) برخوردار بودند، در تست DPPH نیز از بیشترین میزان عملکرد آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال‌های آزاد با میزان IC50=۱۰/٦۱ برخوردارند.

نسبت به عصاره آبی (شکل‌های ۱ و ۲) این یافته‌ها در تایید مصارف سنتی گیاه به عنوان ض التهاب، آنتی اکسیدان، مرحم و ضدعفونی زخمها قابل بحث است (Ran et al., 2008; Mascaraque et al., 2015).

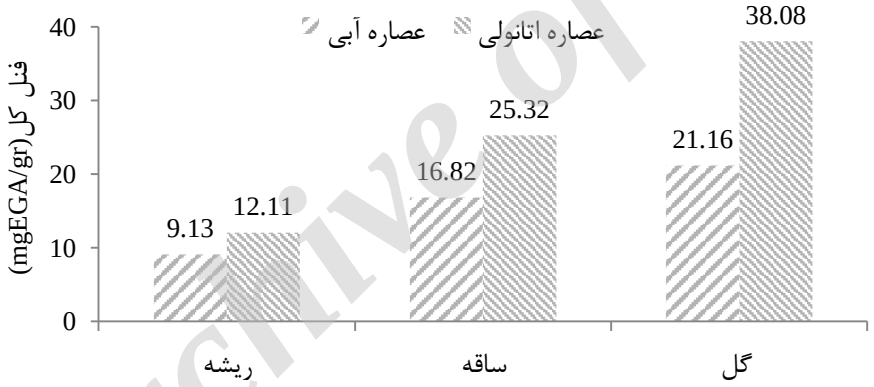
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: مقایسه مقادیر فلاونوئید کل در عصاره‌ها و اندام‌های مختلف گیاه دارویی یونجه زرد در رویشگاه چهارباغ

نتایج بررسی فیتوشیمیایی فلاونوئیدی گیاه طبق شکل ۱، نشان داده شده است که میزان فلاونوئید عصاره اتانولی اندام‌ها به‌ترتیب در گل ٦٢/٤، ساقه ٤٩/٠٩ و ریشه ۳۲/۲۵ میلی‌گرم معادل کوئرسیتین در هر گرم وزن خشک گیاه، از بالاترین مقدار خود برخوردار است.

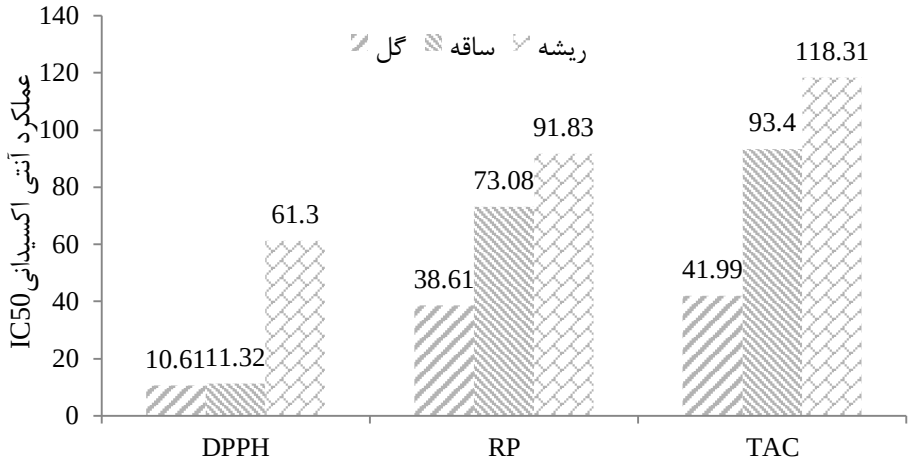


شکل ۲: مقایسه مقادیر فنل کل در عصاره ها و اندام‌های مختلف گیاه دارویی یونجه زرد در رویشگاه چهارباغ

همانطور که در شکل ۲ مشخص است، میزان ترکیبات فنلی عصاره اتانولی اندام‌ها به‌ترتیب در گل ۳۸/۰۸، ساقه ۲۵/۳۲ و ریشه ۱۲/۱۱ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در هر گرم وزن خشک گیاه از بالاترین مقدار برخوردار است. طبق این بررسی، مقادیر فنل و فلاونوئید کل عصاره‌های اتانولی، بیشتر از عصاره آبی بوده است؛ زیرا اتانول حلال بهتری برای ترکیبات ثانویه است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳: مقلیسه عملکرد آنتی اکسیدان عصاره‌های اتانولی اندام‌های مختلف گیاه دارویی یونجه زرد در روش‌های مختلف تست‌های فتوشیمیایی در رویشگاه چهارباغ

آنچه که از نتایج سه روش اندازه گیری عملکرد آنتی‌اکسیدانی بر می‌آید این است که عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی اندام گل گیاه نسبت به ساقه و ریشه مطابق با مقیاس IC50 بیشتر بوده است که علت این امر وجود ترکیبات بیشتر فنلی و فلاونوئیدی است.

جدول ۱: فعالیت آنتی‌باکتریالی و مقادیر MIC عصاره اتانولی گل‌های گیاه یونجه زرد در رویشگاه چهارباغ

Microorganisms	inhibition zone(IZ) (mm) ±SD	MIC (µg/mL)	Gentamycin
Staphylococus aureus	19.1±0.01	24.5	16.7
Staphylococus epidermidis	15.8±0.2	31.3	14.7
Bacillus cereus	14.4 ± 1.12	63.2	16.5
Entrococcus faecalis	12.1±0.76	78.1	9.6
Escherichia coli	11.1 ± 0.5	102.9	11
Pseudomonas .aeroginosa	11.8±1.3	106.1	9
Klebsiella pneumonia	12.7±0.2	119.7	--
Salmonella typhymorium	10.5 ± 0.17	258.6	11
Shigella dysentria	9.5±0.1	260.2	11

MIC: Minimum inhibition concentration

نتایج این جدول نشان می‌دهد که به‌ترتیب باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (19.1mm)، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس (15.8 mm)، باسیلوس سرئوس (14.4 mm) بیشترین را حساسیت نسبت به عصاره گیاه نشان دادند و باکتری‌های گرم منفی عملا غیر حساس و بعضا باکتری‌های شیگلا و سالمونلا مقاوم بودند.

بحث

بررسی نتایج در این تحقیق نشان داد که عصاره اتانولی سرشاخه‌های گلدار، نسبت به اندام ساقه و ریشه، از بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل برخوردار است؛ بنابراین عملکرد آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد و این موضوع یک رابطه منطقی میان نوع اندام ، نوع حلال، کمیت و کیفیت مواد موثره با عملکرد آنتی اکیسیدانی نمونه‌ها نشان می‌دهد در تحقیقات مشابه نیز که در مورد گیاه خرفه و یونجه زرد انجام شد، نشان داده شده که رابطه مثبت میان میزان ترکیبات فنلی و عملکرد آنتی‌اکسیدانی آنها وجود دارد به‌طوری‌که در محیط‌های خشک و شور بیابانی، با افزایش میزان فنل کل، بر عملکرد آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه افزوده شده است. یعنی ترکیبات شیمیایی و

Archive of SID

www.SID.ir

فعال گیاه و از همه مهم‌تر خواص آنتی‌اکسیدانی آنها تحت تاثیر عوامل مختلف محیط متغیر می‌گردد (Mladonevic et al., 2016).

فلاونوئیدها ترکیباتی هستند که مسئول ایجاد رنگ در گل‌ها و میوه‌ها هستند. به عنوان محصولات متابولیسم ثانویه در گیاهان، این ترکیبات به علت فعالیت آنتی اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند (Safaripour et al., 2015; Chaeieb et al., 2011). مکانیسم عمل فلاونوئیدها از به دام اندازی رادیکال‌های آزاد یا شلانه کردن یون‌ها است (Braga et al., 2012; Kazemipour et al., 2014). شواهد اپیدمیولوژی حاکی از آن است که بین مصرف غذایی فلاونوئیدها و ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی رابطه معکوس وجود دارد. آنتی اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که قادر به کند کردن اکسید شدن و یا جلوگیری از آن در دیگر مولکول‌ها می‌شوند. کاربردهای آنتی اکسیدان‌ها در فارماکولوژی بسیار زیاد است. آنتی‌اکسیدان‌ها به‌صورت گسترده در مکمل‌های رژیمی برای سلامتی و همچنین جلوگیری از بیماری‌هایی مثل سرطان و بیماری‌های قلبی (انسداد شریان قلبی) استفاده می‌شوند (Braga et al., 2013; Hirakawa etal., 2000; Bjelakovic et al., 2007).

نتیجه این تحقیق بر مبنای مطالعات مختلف، مشخص می‌سازد که عصاره اتانولی بیش از عصاره آبی توانایی استخراج ترکیبات ثانویه را دارد. احتمالاً بسیاری از ترکیبات موجود در گیاه در حلال‌های آبی، حل نمی‌گردد. در تحقیق مشابه نشان دادند که یک ارتباط مستقیم بین ترکیبات فنلی و فلاونوییدی عصاره‌های مختلف گیاهان مختلف مثل یونجه زرد، سیاه دانه با عملکرد ضد التهابی و ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی گیاه و جود دارد (Mladenovic et al., 2016; Stefanovic et al., 2015; Chaeieb et al., 2011).

در مطالعه‌ای مشابه در بررسی ضد قارچی و ضد میکروبی مشخص گردید که عصارع اتانولی گیاه یونجه زرد در التیام زخم، ضد قارچ و شد التهاب در التیام زخمهای دیابتی موثر است (Mascaraque et al., 2015; Feng et al., 2008; Mladenovic et al., 2016) و این که در مدل کلینیکال اثر تزریقی ml ٤ از عصاره گیاه در روز برای ۲۸ روز روی ١٦ بیمار دارای زخم پای دیابتی مزمن باز را مورد ارزیابی و مقایسه قرار داده است که در طول ۲ هفته بهبودی نشان دادند حالی که روال کاهش سطح زخم‌ها همچنان مشاهده شد. علاوه بر این اثرات جانبی نیز گزارش نشد(Safaripour et al., 2015).

در تایید یافته‌های این تحقیق و بررسی‌های دیگران، مشخص گردید که عصاره گیاه دارای توانایی تحریک سلول‌های پوستی جهت ارتقای احیا بافت، جلوگیری از پیرپوستی و کاهش انباشتگی چربی را دارد (Pastorino et al., 2017; Plesco – Maneo et al., 2002). در بررسی‌های مختلف، بیشترین عملکرد دارویی این گونه را به مواد موثره تانن، کومارین، فنل، فلاونویید، ملیلوتین و پلی فنل‌های گیاه نسبت داده‌اند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، و ضد باکتریال می‌باشند و در مهار رادیکال‌های آزاد عملکرد بهینه‌ای از خود نشان داده‌اند (Hirakawa et al., 2000) به طوریکه کومارین و فلاونوییدهای مستخرج از این گیاه در تست‌های بالینی و حیوانی از عملکرد بهینه آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد باکتریال برخوردار بوده است (Mladenović et al., 2016; Karakas et al., 2012).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که گیاه شاه افسر به‌عنوان یک گیاه علفی که در رویشگاه چهارباغ با ارتفاع ۲۳٤۰ متری می‌روید. عصاره اتانولی اندام‌های

Archive of SID

www.SID.ir

به ترتیب گل، ساقه و ریشه از بالاترین میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدانی برخوردار است؛ و عملکرد آنتی اکسیدان اندام‌های مختلف، نسبت مستقیم با ترکیبات فنل و فلاونوئید دارد که این امر می‌تواند در تایید کاربرد سنتی آن باشد. تاثیرپذیری باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره اتانولی اندام گل بیش از سایر اندام‌هاست. شناسایی مهم‌ترین مواد موثره ثانویه این گیاه و مقایسه عملکرد آن، در اندام‌ها و رویشگاه‌های مختلف در مدل‌های حیوانی و بالینی پیشنهاد می‌گردد.

References

1.Bjelakovic,G., Nikolova,D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G. and Gluud, C. 2007. "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention", systematic review and meta-analysis", 297(8): 842-57.

2.Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, M., Nabavi, F., Ebrahimzadeh, A. and Pourmand, F. 2011. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of walnut. Journal of Medicinal Plants Research vol 5(7),pp.11

3.Grossberg, G.T. and Fox, B. 2007. The essential herb-drug-vitamin Interaction Guide. New York: Broadway Books. 30p.

4.Mazandarani, M., Mirdeilami, S.Z. and Pessarakli, M. 2013. Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in North east of Iran. Journal of Medicinal Plants Research, 7(16): 1063-1069.

5.Mladenović, K.G., Murozovic Z. and Stefanovic, O. 2016. Antimicrobial, antioxidant and antibiofilm activity of extracts of *Melilotus officinalis* (L.) Pall", The Journal of Animal and Plant Sciences, (26)5.

6.Pastorino, G., Marchetti, C. and Borghesi, B. 2017. Biological activities of the legume crops *Melilotus officinalis* and *Lespedeza capitata* for skin care and pharmaceutical applications. Industrial crops and products, 96: 158-164.

7.Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphmolybdeum complex: Specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, 269: 337-341.

8.Stefanovic, D., Tesic, D. and Ljiljana, R. 2015. Melilotus albus and Dorycnium herbaceum extracts as source of phenolic compounds and their antimicrobial, antibiofilm and antioxidant potentials. Journal Food Drug Journal of Food and Drug Analysis, 23(3): 417-424.

9.Mladenoviv, K.G. ,Murozunovic, M.Z., Stefanovic, O. and Comic, L. 2016. Antimicrobial, antioxidant and antibiofilm activity of extracts of *Melilotus officinalis* (L.) pall. The Journal of Animal and Plant Sciences, 26(5): 1436-1444.

10.Braga, P.C., Sasso, M.D., Lattuada, N., Marabini, L., Calò, R., Antonacci, R., Bertelli, A., Falchi1, M. and Verducci, P. 2013. Antioxidant activity of *Melilotus officinalis* extract investigated by means of the radical scavenging activity, the chemiluminescence of human neutrophil bursts and lipoperoxidation assay. Journal of Medicinal Plants Research 7(7): 358-365.

11.Chaieb, K., Kouidhi,B., Jrah, H., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. 2011. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. BMC Complementary and Alternative Medicine. 11: 29.

12.Feng, D.X., Tao, F.J., Gang, F., Feng, H.L. and Xing, Z. 2008. Antifungal activities of the extracts from *Melilotus officinalis* Desr. China. Acta. Bot. Boreali-Occidential. Sinica. 6: 1233-1238.

13.Karakas, F.P., Yildirim, A. and.Turker, A. 2012. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities, Turkish. Journal of Biology. 36: 641-652.

.14.Safarpour, A., Kaviyani, F., Sepehrimanesh, M., Ahmadi, N., Koohi Hosseinabadi, O., Tanideh, N. and

Archive of SID

www.SID.ir

Showraki, N. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory effects of gel and aqueous extract of *Melilotus officinalis* L. in Induced Ulcerative Colitis: A Rattus norvegicus Model. Annals of Colorectal Research; 3(2): e29511. 1-7

15.Mascaraque, C., Gonzalez, R., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Sanchez de Medina, F. and Martinez-Augustin, O. 2015 Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium. British Journal of Nutrition. 113(4):618–26

16.Kazemipour, N., Nikbin, M., Davarimanesh, A. and Sepehrimanesh, M. 2014. Antioxidant activity and mineral element contents of *Calotropis procera* from Iran: a traditional medicinal plant in Middle East. Comparative Clinical Pathology, 1–4.

17.Plesca-Manea, L., Parvu, A.E., Parvu, M., Taamas, M., Buia, R. and Puia, M. 2002. Effects of Melilotus officinalis on acute inflammation. Phytother Research. 16(4): 316–9. 14.

18.Hirakawa, T., Okawa, M., Kinjo, J. and Nohara, T. 2000. A new *oleanene glucuronide* obtained from the aerial parts of *Melilotus officinalis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 48(2): 286–7

19..Ran, Z.H., Chen, C. and Xiao, S.D. 2008. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates rats colitis induced by acetic acid. Biomedicine and Pharmacotherapy, 62(3):189–96. 37.

20.Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 5 (11): 1142-1145.

21.Chorepsima, S., Tentolouris, K., Dimitroulis, D. and Tentolouris, N. 2013. *Melilotus*: Contribution to wound healing in the diabetic foot. Journal of Herbal Medicine. 3. 81-86.

21. Meena,P.D., Rani,A.,Meena.R., Sharma.P., Gupta,Rand howdappa,P.2012. Aggressiveness, diversity and distribution of Alternaria brassicae isolates infecting oilseed Brassica in India. African Journal ofMicrobiology Research Vol. 6(24),pp. 5249-5258

Archive of SID

www.SID.ir

Eco phytochemical, Ethnopharmacology, Antioxidant and anti bacterial activity in different extracts of *Melilotus officinalis* L. from Chaharbagh mountainous region- Semnan province

Borhani G.[1], Mazandarani M.[2]*, Abbaspour H.[3]

[1]Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
[2]Associated Professor, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
[3]Associated Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Received Time: 2017/12/31 Accepted Time: 2018/5/28

Abstract

Melilotus officinalis L. is belongs to Fabaceae family, which has been used as a tonic, anti carminative, anti infection, anti diabetes and externally as a poultice for pains and ulcer wound. In many field observation the most ecological requirenments of *M.officinalis* L. and important experiences about traditional uses of this plant were obtained from rural healers. Different parts of plant (aerial parts in flowering stage, stem and root) were collected from Charbagh Mountain (2300 msl) in May 2016. The ethanol and water extracts of plant parts were obtained by maceration method, Total phenol (TP) and flavonoid (TF) were estimated by spectrophotometry. The antioxidant capacity was evaluated in vitro by the method of trapping the free radical DPPH, TAC and RP assay. The antibacterial activity were obtained in vitro by using disc diffusion and the minimum inhibitory concentration (MIC) assay . According to the results aerial parts of this plant which has been used in this region as an anti infection, anti inflammation and tonic to treat of diabetes and arthritis. phytochemical tests were showed that the ethanole extract of flowers had the highest total phenols concentration(38.08±o.13 mgGA/g), total flavonoids (62.04 ±0.01 mgQU/g) and antioxidant activity especially in DPPH radical scavenging with IC50=10.61±0.81µg/ml, in compare of BHA and BHT. The ethanole extract of flowers in 2300 m were showed the highest antimicrobial activity, especially against *Staphylococus aureus*, *S.epidermaidis* , *Bacillus cereus* and *Entrococus faecalis* L., respectively. In conclusion, there is the strong positive correlation between influence of extraction, plant parts on phytochemistry, antibacterial and antioxidant activity of *M. officinalis* L. and indicated that the ethanol exctract of flowers exhibited the highest antioxidant and antibacterial activity. So it can be used potentially as a good source of natural antioxidant .

***Keywords*:** Antioxidant, Antibacterial, Ethnopharmacology, Flovonoides, *Melilotus officinalis* L., Phytochemical, Semnan province

TF: Total flavonoide; **TP:**Total phenols; **TAC:** Total antioxidant capacity, (**DPPH**) 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl.(**RP)** reducing power; **BHA**: butylated hydroxyanisole**; BHT**: butylated hydroxytoluene

Archive of SID

www.SID.ir