نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هفتم، شماره چهارم، ۱۳۹۹
۲۱۱-۲۲۵
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2020.17332.2594

ارزیابی فعالیت‌های زیست‌شناختی اسانس و عصاره‌های صمغ گیاه وشا (*Dorma ammoniacum* D.)

***محسن مظاهری تهرانی[۱،۲]، رحمان حسین‌زاده[۳]، مریم مهاجرانی[۴]، محمود تاجبخش[۳] و صمد نژاد ابراهیمی سردرود[۵]**

[۱]دانش‌آموخته دکتری شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران،
[۲]مربی گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران،
[۳]استاد گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران،
[۴]دانشیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران،
[۵]استادیار گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲٤

چکیده

سابقه و هدف: وشا یک گیاه مونوکارپیک (تک‌زاد) است که بومی مرکز ایران است. حضور سسکویی‌ترپن‌ها در صمغ گیاه، نقش دفاعی مهمی در برابر قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا ایجاد می‌کند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس و عصاره‌های اتیل استات، کلروفرم، هگزان و متانولی و اسانس صمغ وشا و هم‌چنین تعیین ترکیبات موجود در اسانس است. با توجه به این‌که شرایط اقلیمی بر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار است، در این پژوهش عصاره صمغ گیاه وشای موجود در منطقه شاهرود از دیدگاه فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: اسانس صمغ گیاه وشای جمع‌آوری‌شده از اطراف روستای طرود شاهرود با استفاده از GC و GC / MS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسله با استفاده از حلال‌های با قطبیت مختلف از جمله هگزان، کلروفرم، اتیل استات و متانول انجام گرفت. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس به همراه عصاره‌های اتیل استات، کلروفرم، هگزان و متانولی صمغ دورما آمونیکوم با استفاده از روش[۱] DPPH و غربالگری ضد باکتریایی با استفاده از روش انتشار دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوشن انجام شد. حداقل غلظت مهارکنندگی[۲] (MIC) و حداقل غلظت میکروب‌کشی[۳] (MBC) در برابر تعدادی از باکتری‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان **داد که** عصاره اتیل استات با $IC_{50} = 69.0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اسانس صمغ با $IC_{50} = 166.0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسطی می‌باشد. عصاره‌های متانولی (۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کلروفرمی (٦۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) فعالیت ضد باکتری خوبی از خود نشان

* مسئول مکاتبه: m.mazaheri@gu.ac.ir

1- 2, 2-diphenyl-1- picrylhydrazyl
2- Minimum inhibition concentration
3- Minimum bactericidal concentration

دادند. تجزیه اسانس اولئوگام رزین گیاه به‌وسیله دستگاه GC-MS منجر به شناسایی ۵۱ ترکیب شد. عمده‌ترین این ترکیبات شامل، متیل اولئات (۲۰/۲ درصد)، متیل پالمیتولئات (۱۵/۹ درصد)، فنچیل استات (۷/۲۵ درصد)، متیل لینولئات (٦/۸۷ درصد)، متیل استئارات یا متیل اکتادکانوئات (٦/٦٤ درصد)، اولیک اسید (٤/۹۷ درصد)، پنتادکان (۳/۱٤ درصد)، آلفا- گیورجیونن (۲/٦٦ درصد) و بتا- بیسابولن (۲/٦ درصد) می‌باشند.

نتیجه‌گیری: آمونیکوم به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های جنس دورما است. وجود ترکیبات تأیید شده، فنولی و پلی‌فنولی موجود در عصاره یا اسانس و هم‌چنین حضور ترکیبات سسکویی‌ترپن کومارین‌ها / فنل‌ها در عصاره اولئوگام رزین که باعث فعالیت زیست‌شناختی مانند آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی و حتی ضد آلزایمر عصاره‌های صمغ گیاه *دورما آمونیکوم* گردیده و این گیاه را به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای کاربرد دارویی مطرح می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که برخی عوامل بیرونی مانند آب و هوا، خصوصیات خاک، تنش حشرات ریزجانداران، زمان برداشت محصول، روش تهیه گیاه و روش استخراج اسانس *دورما آمونیکوم*، می‌توانند در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها و عصاره‌ها نقش داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: اسانس، *دورما آمونیکوم*، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت‌های ضد باکتری

مقدمه

امروزه بشر با پیشرفت علم و فن‌آوری موفق به کشف ساختار و خواص مواد موجود در گیاهان و استفاده بهتر از آن‌ها شده است. چرا که استفاده دارویی و صنعتی از گیاهان به‌صورت خام تأثیرات مثبت کمی به جای می‌گذارد، بنابراین شناسایی و تخلیص مواد مؤثر موجود در آن‌ها با کاربردهای دارویی و صنعتی از ضرورت و اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (٦). در گذشته از گیاهان به‌عنوان منبعی غنی، در علم پزشکی استفاده می‌شد زیرا ذخیره‌ای از عوامل شیمیایی را دربردارند (۱۸ و ۲۸). گیاه وشا با نام علمی (*Dorma ammoniacum*) از جنس *دورما* متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) که در ایران دارای حدود ۷ گونه می‌باشد که گونه‌های *آمونیکوم* و *آیوچری* (*D. aucheri*) بومی ایران می‌باشند (۱۹ و ۳۱). گیاهی چند ساله دائمی و پایا بوده و از جمله گونه‌های در معرض انقراض می‌باشد که بین ۱ تا ۳ متر ارتفاع دارد. طول عمر آن بین ۵ تا ۷ سال است که در سال آخر پس از تولید ساقه و بذر از بین می‌روند. تجدید حیات مجدد گیاه از طریق بذر است (۱۹). در سال‌های اخیر کارهای فراوانی نیز در خصوص تکثیر گیاه فوق در آزمایشگاه انجام شده است (۹). مهم‌ترین ویژگی و ارزش این گیاه تولید صمغ یا شیرابه‌ای به نام گام آمونیاک (اولئوگام رزین) می‌باشد که شیرابه حاصل از این گیاه به دو صورت اشکی (از طریق ساقه) و از طریق ریشه به روش تیغ‌زنی در سال سوم رشد گیاه میسر می‌باشد، که در ایران به نام‌های محلی وشق، وشا و کما- کندل نام برده می‌شود که دارای اهمیت دارویی بوده و به‌عنوان آمونیکوم ایرانی در لیست داروهای یونانی و لاتین به آن اشاره شده است (۵، ۱۷، ۱۸ و ۱۹). بررسی‌ها نشان می‌دهد که ریشه گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی قوی می‌باشد و رزین آن فعالیت ضد قارچی از خود نشان می‌دهد (۲۰، ۲۲ و ۲٤). بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی یک روش معمول است، همان‌گونه که اغلب از آنتی‌بیوتیک‌ها یا ضدعفونی‌کننده‌ها در برابر گونه‌های باکتری استفاده می‌شود. عصاره‌ها و اسانس‌ها اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند (۲). بررسی اثر سمیت

روغن فرار میوه *دورما آمونیکوم* (استخراج شده توسط روش تقطیر با آب) علیه دو رده سلول سرطانی انسانی (MCF و SW480) و سلول‌های طبیعی (HFSF و HFLP) نشان داد که روغن فوق دارای اثر سمیت پایین ولی دارای فعالیت ضد میکروبی قوی می‌باشد (۲۱ و ۳۰). آنالیز ترکیبات روغن‌های فرار اندام‌های هوایی گیاه *دورما آیوچری* (۱٦) و برگ‌های وشا (۲٦) و بررسی اثر ضد میکروبی روغن فرار میوه با روش دیسک دیفیوژن نشان می‌دهد که روغن دارای فعالیت ضد میکروبی قوی روی *بی.ساتلیوس* (*B. subtilis*) و *اس.اپیدمیدیس* (*S. epidemidis*) می‌باشد (۳۱). اولئوگام رزین گیاه وشا حاوی مقدار کمی اسانس (۰/٤-۰/۱ درصد)، رزین (۷۰-٦۰ درصد) و صمغ (۲۲ درصد) بوده و شامل ترکیبات شیمیایی مانند اسید سالیسیلیک آزاد، آمورزینول (Ammoresinol)، دورمین (Doremine)، دورمین A (Doremine A) و آمودورمی (Ammodoremi) می‌باشد (۱ و ۲۳). براساس پژوهش‌های انجام شده بر روی اسانس‌های استخراج شده از ریشه و اندام‌های هوایی گیاه، اسانس‌های استخراج شده عمدتاً شامل بتا- هیما چالن (۹/۳ درصد) و بتا- چامیکرن (۸/۷ درصد) در ریشه و بتا- بیسابولن (۱۵/۱ درصد) و هگزا دکانال (۱۳/۲ درصد) ترکیبات عمده اندام‌های هوایی گیاه می باشند (٤) و اسانس میوه گیاه شامل استریو ایزومرهای اوسیمنون (٤۰/٤ درصد) و بتا- سیکلوسیترال (۹/۹ درصد) می‌باشند (۳۰). هم‌چنین اسانس برگ‌های گیاه فوق غنی از سسکوئیترپن (۹۰/۲ درصد) بوده که بیش‌ترین مقدار آن را ترکیبات آلفا- گیورجیونن (٤۹/٥ درصد) و بتا- گیورجیونن (۱۹ درصد) تشکیل می‌دهند (۲٦). ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به کمک معرف DPPH انجام می‌گیرد، این معرف ترکیبی است بنفش رنگ که به‌دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن به راحتی به‌صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH، در ٥۱۷ نانومتر جذب دارند که کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی‌اکسیدان رابطه خطی دارد. هرچه بر مقدار ماده آنتی‌اکسیدان افزوده شود، DPPH بیش‌تری مصرف شده و رنگ بنفش بیش‌تر به‌سمت زرد میل می‌کند (٥). مطالعه حاضر با هدف شناسایی ترکیبات اسانس و نیز ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس و عصاره‌های حاصل از صمغ گیاه وشا و مقایسه فعالیت‌های زیست‌شناختی آن با تغییر حلال عصاره‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

صمغ از ساقه گیاه وشا در تیرماه سال ۱۳۹۷ از ارتفاعات ۱٤۰۰ متری اطراف روستای طرود شاهرود به مختصات عرض جغرافی "٥۸/٦ '۲٦ °۳٥ و طول جغرافی "۳٤/٦ '۰۰°٥٥ جمع‌آوری شد و شناسایی گیاه موردنظر در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه گلستان گرگان و با کد هرباریومی ٦۲٥۱ انجام گرفت. اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. که ۲٥۰ گرم از صمغ گیاه را همراه با ٦۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل یک بالن ۱ لیتری قرار داده شد و پس از خیس خوردن، اسانس‌گیری در مدت ٥ ساعت انجام شد. سپس اسانس حاصل توسط سدیم سولفات آبگیری شد و تا زمان آنالیز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید. عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسله انجام گرفت، که از ٤۰ گرم صمغ با استفاده از ۲٥۰ میلی‌لیتر حلال (کلروفرم، هگزان، اتیل استات و متانول هر کدام جداگانه) به‌مدت ۸ ساعت به‌عمل آمد. عصاره حاصل از اجزای جامد باقی‌مانده جدا گردید و پس از تبخیر حلال

به‌وسیله دستگاه دوار تقطیر در خلأ[1]، عصاره قهوه‌ای رنگ و به حالت مایع غلیظ و چسبناک به‌دست آمد.

شناسایی اجزاء اسانس با دستگاه GC-MS: شناسایی اجزاء اسانس با دستگاه GC-MS دارای کروماتوگرافی گازی ساخت شرکت اجیلنت مدل ۷۸۹۰N متصل شده به طیف‌سنج جرمی مدل ۵۹۷۵C EI دارای ورودی از نوع اسپلیت و فاز متحرک هلیم و ستون HP-5MS با فاز ثابت سیلیکاژل همانند ستون مورد استفاده در دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام گرفت. مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسانس را در داخل ۱۰۰ میکرولیتر از n- هگزان رقیق کرده و به دستگاه کروماتوگرافی ذکر شده تزریق شد. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید که دمای اولیه ستون ٦۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ٤ دقیقه نگهداری و سپس با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش و برای ۲ دقیقه در این دما باقی ماند، سپس با سرعت ٤ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۲۲۵ درجه سانتی‌گراد رسید و ثابت گردید. تزریق و آشکارسازی هر دو در دمای ۲٦۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. گاز حامل هلیوم با سرعت خطی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه جریان داشت (۱۳). شناسایی ترکیب‌ها با مقایسه این طیف‌ها با طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و همچنین اطلاعات موجود کتابخانه ای (Wiley و NIST) دستگاه GC-MS مورد تأیید و شناسایی کیفی قرار گرفت. برای تایید نهایی، لازم است با استفاده از زمان بازداری[2]، شاخص بازداری[3] (شاخص کواتس[4]) اجزاء محاسبه گردد (۱۰).

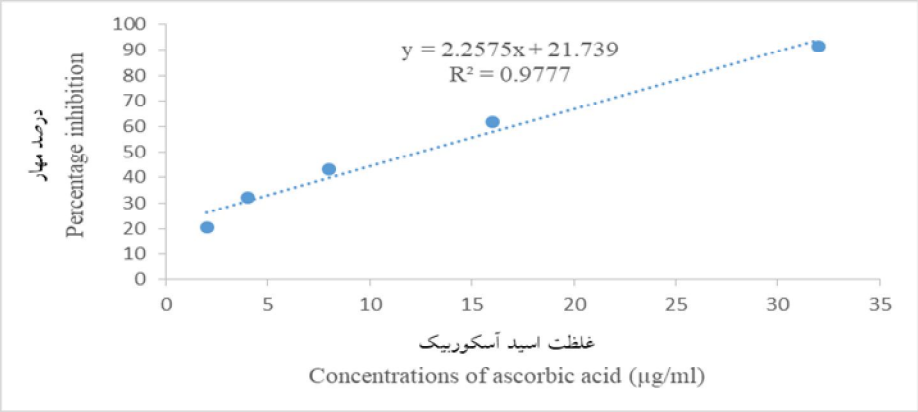
بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌ها به روش DPPH: اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری مهار رادیکالی به کمک معرف DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت ۳۲ µg/ml از عصاره‌ها و اسانس تهیه و از آن در ٤ مرحله رقیق‌سازی در لوله‌های آزمایش صورت گرفت و در نهایت حجم ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۰۰٤ درصد DPPH به هریک از لوله‌های آزمایش اضافه گردید. لوله‌ها به‌مدت زمان ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد. جذب محلول‌ها نسبت به شاهد بعد از این مدت زمان، در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis خوانده و درصد مهار رادیکال آزاد (I%) به‌وسیله رابطه زیر محاسبه گردید (۱۵):

$$I\,\% = (A_{Control} - A_{Sample} / A_{Control}) \times 100 \quad (۱)$$

که در آن، $A_{Control}$ جذب محلول کنترل (حاوی همه اجزا واکنشگر بدون نمونه) در ۵۱۷ نانومتر و A_{Sample} جذب محلول حاوی نمونه در ۵۱۷ نانومتر.

در این آزمایش حلال متانول به‌عنوان شاهد برای صفر کردن دستگاه Uv-Vis و محلول متانولی DPPH به‌عنوان نمونه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. با رسم منحنی درصد I در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره مقدار IC_{50} (غلظتی از عصاره بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر که برای کاهش DPPH به‌میزان ۵۰ درصد مقدار اولیه) با توجه به معادله خط حاصله تعیین گردید. اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت انتخاب گردید (شکل ۱). این آزمایش برای نمونه و استاندارد سه بار تکرار گردید.

1- Rotary evaporator
2- Retention time
3- Retention Index
4- Kovats Index



شکل ۱- منحنی استاندارد اسید آسکوربیک.

Fig. 1. Ascorbic acid standard curve.

بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره‌ها به روش دیسک دیفیوژن[1]: ۵۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره را وزن کرده و با حلال حجم را به ۱ میلی‌لیتر رساندیم (۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) سپس عصاره‌ها را با حلال رقیق کرده و غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵۰، ۳۱/۲۵، ۱۵، ۷/۵۰ و ۳/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آن‌ها تهیه شد. به‌منظور انجام آزمایش ابتدا برای تهیه کشت تازه، ۱ کلونی از هر باکتری به کمک لوپ استریل (فیلدوپلاتین حلقه‌ای) بر روی محیط مولر هینتون آگار[2] به روش خطی چهار منطقه‌ای کشت داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از باکتری‌های فعال شده سوسپانسیونی با کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند[3] (10^8 cfu[4]/ml × ۱/۵) در سرم فیزیولوژی استریل (محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم) تهیه شدند. در مدت ۱۵ دقیقه از زمان تنظیم کدورت سوسپانسیون باکتری با استاندارد نیم مک فارلند، عمل تلقیح باکتری بر روی محیط کشت صورت گرفت. بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره را با فواصل حداقل ۲ سانتی‌متر از همدیگر قرار دادیم، بعد از ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷-۳۵ درجه قطر هاله عدم رشد را برای هر غلظت عصاره بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری کرده و قطرهای بالاتر از ۱۴ میلی‌متر را به‌عنوان حساس در نظر گرفته شد. همه تست‌ها ۳ بار تکرار شدند و از قطرهای عدم رشد میانگین گرفته شد. از دیسک حاوی حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان شاهد منفی و از دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید (۲۶).

بررسی اثر ضد باکتریایی روش رقت‌سازی در چاهک[5] **(میکروبراث دایلوشن):** سویه‌های استاندارد باکتری‌های مورد آزمایش در این پژوهش شامل دو گروه گرم مثبت و گرم منفی بودند. این سویه‌ها شامل: باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *لیستریا منوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) و *انتروکوک فکالیس* (*Enterococcus faecalis*) و باکتری‌های گرم منفی *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*) و *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) بودند. برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک (میکروبراث دایلوشن) از پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا استفاده شد. اسانس و عصاره‌ها کدگذاری شدند (۱= هگزان، ۲=

1- Disk diffusion
2- Mueller-Hinton agar
3- Mac Farland
4- Colony forming unit

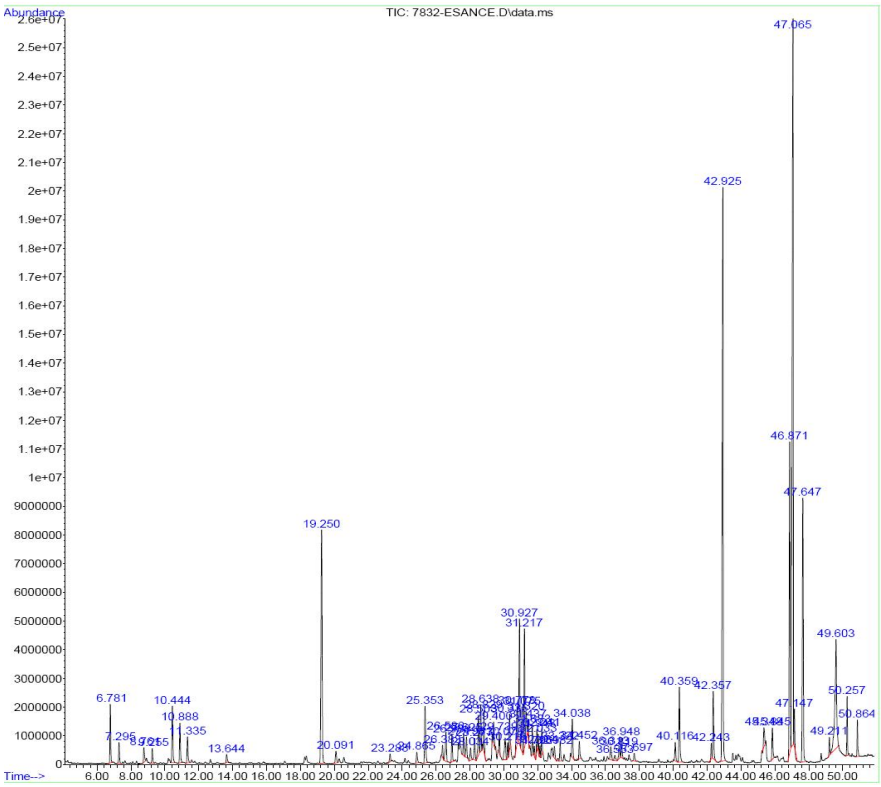
5- Broth microdilution

اتیل استات، ۳= متانول و ٤= کلروفرم) و در ادامه یک محلول استوک ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از اسانس و عصاره (شامل ۰/٤ گرم نمونه، ۱ میلی‌لیتر DMSO و ۱۹۹ میلی‌لیتر محیط کشت برین هارت اینفیوژن براث[1]) تهیه و از آن به‌ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ٦۲/۵۰، ۳۱/۲۵، ۱۵/٦۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید (١٤). پس از آماده‌سازی، پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی (10^6cfu/ml) از رقت نیم مک فارلند استفاده شد. میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ٦۳۰ نانومتر قرائت شد. اولین خانه‌ای که هیچ کدورتی در آن مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین گردید. غلظتی که در آن شمارش تعداد کلنی صفر بود، به‌عنوان حداقل غلظت میکروبکشی برای هر باکتری تعیین گردید (۷).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای تجزیه آماری داده‌های به‌دست آمده، از نرم‌افزار Minitab نسخه ١٦ استفاده شد. داده آزمایش‌ها بر اساس واریانس یک‌طرفه و دوطرفه (One – Way Anova و Two – Way Anova) تجزیه و تحلیل شد. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج و بحث

از آنالیز اسانس صمغ ساقه گیاه وشا مجموع ۵۱ ترکیب شناسایی شد (شکل ۲) که ۹۸/۲۲ درصد کل ترکیبات اسانس را تشکیل دادند.



شکل ۲- طیف GC-MS اسانس اولئوگام رزین گیاه *دورما آمونیکوم*.

Fig. 2. GC-MS spectrum of essential oil of *D. ammoniacum* gum.

1- Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

فهرست کامل و میزان ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس اولئوگام رزین گیاه دورما آمونیکوم در (جدول ۱) آورده شده است.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس اولئوگام رزین *دورما آمونیکوم* با GC-MS.

Table 1. Chemical composition of the essential oil of *D. ammoniacum* gum with GC-MS.

ردیف No	ترکیب Compounds	زمان بازداری RT(min)	ضریب بازداری (RI)	درصد %
1	Alpha.-pinene	6.783	939	1.14
2	Camphene	7.296	951	0.44
3	6-Methyl-5-hepten-2-one	8.760	985	0.36
4	Decane	9.253	997	0.33
5	dl-Limonene	10.444	1030	1.38
6	trans-.beta.-Ocimene	10.888	1032	1.61
7	Linalool	13.644	1097	0.22
8	Fenchyl acetate	19.251	1222	7.25
9	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)	20.088	1235	0.37
10	Tridecane	23.288	1299	0.21
11	1,5,9-Undecatriene, 2,6,10-trimethyl-, (Z)	25.352	1352	1.57
12	Cadina-1,4-Diene	26.384	1377	0.26
13	Cedr-8-ene	26.568	1381	1.34
14	alpha.-Gurjunene	26.939	1390	2.66
15	Junipene	27.627	1406	0.49
16	Beta.-Funebrene	27.796	1411	0.51
17	3-t-Butyl-4-methoxyphenol methyl derivative	28.274	1426	0.56
18	gymnomitrene	28.829	1442	0.87
19	bicyclogermacrene	29.399	1458	0.52
20	Di-epi-.alpha.-cedrene	29.738	1468	0.42
21	beta.-Chamigrene	30.077	1477	0.77
22	gamma.-curcumene	30.220	1480	0.94
23	alpha-Curcumene	30.333	1487	0.72
24	trans-7-pentadecene	30.780	1496	1.01
25	Pentadecane	30.929	1501	3.41
26	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl)-, (R)	31.073	1504	1.09
27	beta.-Bisabolene	31.217	1513	2.60
28	delta.-Cadinene	31.684	1519	0.62
29	1H-Pyrrole, 1-butyl	31.797	1527	0.22
30	delta.-Selinene	32.136	1538	0.20
31	Selina-3,7(11)-diene	32.239	1542	0.51
32	Nerolidol	32.983	1565	0.31
33	1,6-Octadiene, 3,7-dimetheyl	33.322	1576	0.47
34	1,1-Dimethyl-3-methylidene-2-vinylcyclohexane	34.036	1598	0.97
35	Hexadecanal	34.452	1612	0.41
36	8-Heptadecene	36.316	1678	0.44
37	2-Pentadecanone	36.948	1698	0.50
38	Methyl myristate	37.697	1725	0.21
39	Tetradecanal	40.116	1816	0.45
40	Methyl pentadecanoate	40.357	1826	1.87
41	Methyl palmitoleate	42.925	1977	15.90
42	[1]Benzothieno[2,3-c] isoquinoline, 5-phenyl	45.349	2030	0.47
43	Hexadecanoic acid	45.847	2052	0.76
44	Methyl linoleate	46.869	2091	6.87
45	Methyl oleate	47.064	2103	20.20
46	8-Octadecenoic acid, methyl ester	47.146	2104	0.49
47	Methyl stearate	47.644	2130	6.64
48	Docosane	49.211	2199	0.32
49	Oleic acid	49.601	2216	4.97
50	Ethyl arachidonate	50.258	2258	0.97
51	Tricosane	50.864	2295	0.67
Total identified				98.22

ترکیبات اصلی شامل، متیل اولئات (۲۰/۲ درصد)، متیل پالمیتولئات (۱۵/۹ درصد)، فنچیل استات (۷/۲۵ درصد)، متیل لینولئات (٦/۸۷ درصد)، متیل استئارات یا متیل اکتادکانوئات (٦/٦٤ درصد)، اولیک اسید (٤/۹۷ درصد)، پنتادکان (۳/۱٤ درصد)، آلفا- گیورجیونن (۲/٦٦ درصد)، بتا- بیسابولن (۲/٦ درصد) می‌باشند. از مقایسه مواد تشکیل‌دهنده اسانس‌های استخراج شده از ریشه، اندام‌های هوایی و برگ‌های گیاه با اسانس صمغ گیاه *دورما آمونیکوم*، ترکیبات مشترک که در صد بیش‌تری را شامل می‌شوند، عبارتند از: آلفا- گیورجیونن با مقدار (۲/٦٦ درصد) در اسانس صمغ و به‌میزان (٤۹/۵ درصد) در اسانس برگ‌ها، بتا- بیسابولن (۲/٦ درصد) در اسانس صمغ و به‌میزان (۱۵/۱ درصد) در اندام‌های هوایی، بتا- چامیکرن (۸/۷ درصد) در ریشه و به‌میزان جزیی (۰/۷۷ درصد) در اسانس صمغ و ایزومرهای اوسیمنون (٤۰/٤ درصد) در اسانس برگ‌ها و به‌میزان کم (۱/٦۱ درصد) در اسانس صمغ گیاه موجود می‌باشد. نتایج فوق نشان می‌دهد که درصد ترکیبات مؤثر مشترک در اسانس صمغ گیاه بسیار کم‌تر از اسانس سایر اندام‌های گیاه می‌باشد ولی از طرف دیگر ترکیبات اصلی اسانس فوق منحصراً در اسانس صمغ این گیاه موجود می‌باشد.

نتایج عملکرد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها: مقادیر IC_{50} اسانس **و** عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های هگزانی (با قطبیت ۰/۱)، کلروفرمی (با قطبیت ٤/۱)، اتیل استاتی (با قطبیت ٤/٤)، متانولی (با قطبیت ۵/۱) و اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت (استاندارد) به‌ترتیب در (جدول ۲) آورده شده است.

جدول ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های صمغ *دورما آمونیکوم*.

Table 2. Antioxidant activity of essential oil and extracts of *D. ammoniacum* gum.

عصاره‌ها Extracts	IC_{50}(µg/ml)
هگزان Hexane	267.0±0.6
کلروفرم Chloroform	215.0±0.6
اتیل استات Ethyl Acetate	69.0±0.4
متانول Methanol	233.0±0.3
اسانس Essential oil	166.0±0.4
اسید اسکوربیک Ascorbic Acid	12.0±0.2

نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین عصاره‌ها و اسانس از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (P=۰/۰۰۰۱) (جدول ۳).

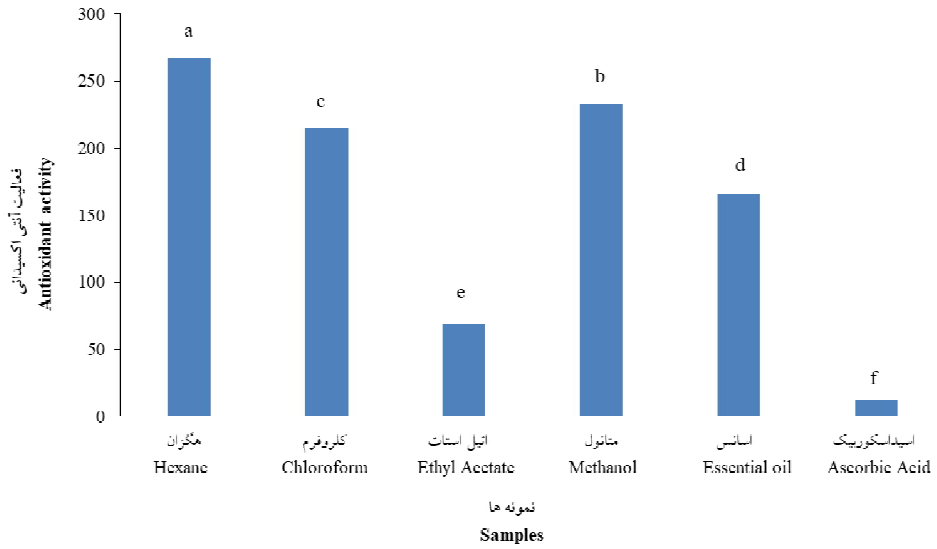
جدول ۳- آنالیز واریانس یکطرفه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره صمغ *دورما آمونیکوم*.

Table 3. Analysis of variance one way of antioxidant activity of essential oil and extracts of *D. ammoniacum* gum.

منبع Source	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی Degrees of freedom	مقدار F F value	مقدار معنی‌دار Significant value
عصاره Extracts	15.007	5	153917.95	0.0001
خطا Error	0.0002	12		
کل Total	15.0072	17		

هم‌چنین آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) نشان داد که تمام نمونه‌ها با هم اختلاف معنی‌داری دارند (شکل ۳). بنابراین اسانس صمغ *دورما آمونیکوم* دارای فعالیت آزادسازی رادیکال آزاد متوسط است ولی عصاره اتیل استاتی صمغ *دورما آمونیکوم* دارای بیش‌ترین فعالیت آزادسازی رادیکال آزاد با مقدار IC_{50} برابر با ۶۹/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (در مقایسه با اسید آسکوربیک با IC_{50} برابر با ۱۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد، در حالی‌که سایر عصاره‌ها دارای فعالیت متوسط هستند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به‌ترتیب عبارت است از:

عصاره اتیل استاتی > عصاره کلروفرمی > عصاره متانولی > عصاره هگزانی



شکل ۳- مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های صمغ *دورما آمونیکوم*.

Fig. 3. Comparison of antioxidant activity of essential oil and extracts of *D. ammoniacum gum*.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتیل استاتی و کلروفرمی ریشه *دورما آمونیکوم* با IC_{50} برابر با ۲۱/۳ و ۳۱/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و عصاره اتیل استاتی قطعات هوایی با IC_{50} برابر با ٦۲/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر، گزارش گردیده (٤). علاوه بر این، عصاره هیدروالکلی *دورما آیتی چیسونی*[1] و عصاره اتانولی بخش‌های هوایی *دورما آچری* دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ضعیف با IC_{50} برابر با ٤۸۸ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشند (۱۲ و ۲۰). اسانس ریشه *دورما گلابروم* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی می باشد (۳). در مورد خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توان به نوع و درصد متابولیت‌های ثانویه تشکیل‌دهنده عصاره که تحت‌تأثیر ژنتیک و شرایط تنش‌های محیطی می‌باشد، اشاره نمود. چرا که بیش‌تر خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان به ترکیبات فنولی و پلی‌فنولی موجود در عصاره یا اسانس استخراج شده از گیاه بر می‌گردد. نقش اصلی ترکیبات فنولی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد اثبات گردیده است (۱۱). در عصاره صمغ *دورما آمونیکوم* نیز حضور ترکیبات سسکویی ترپن کومارین‌ها / فنل‌هایی می‌تواند با فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره صمغ گیاه در ارتباط باشد (۳، ۸ و ۲۹).

بررسی خاصیت ضد باکتریایی اسانس و عصاره‌ها: باکتری‌های *لیستریا منوسیتوژنز*، *انتروکوک فکالیس*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به تمامی غلظت‌های عصاره‌ها فاقد هاله عدم رشد بوده، در نتیجه مقاوم در برابر عصاره می‌باشند، در صورتی‌که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای هاله عدم رشد می‌باشد (جدول ٤ و شکل‌های ٤ و ٥).

جدول ٤- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها علیه سو یه *استافیلوکوکوس اورئوس* (میلی‌متر).

Table 4. Means of the diameter of inhibition zone the extracts of ammoniacum gum by *S. aureous* (mm).

غلظت عصاره Concentration of extract (mg/mL)	هگزان Hexane	کلروفرم Chloroform	اتیل استات Ethyl Acetate	متانول Methanol
500	20	23	19	22
250	18	22	19	22
125	17	21	18	21
62.50	17	20	18	20
31.25	17	20	18	20
15	14	17	16	17
7.50	9	15	12	14
3.75	0	12	0	8

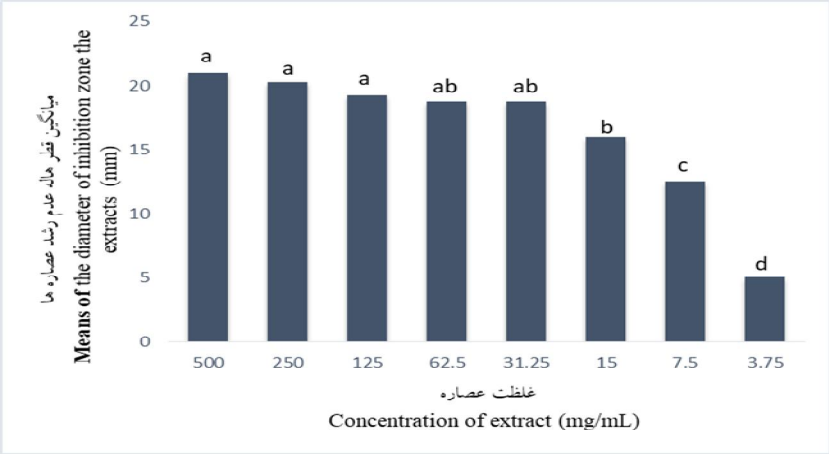
نتایج تجزیه واریانس دو طرفه نشان می‌دهد، اثر نوع عصاره و غلظت معنادار بوده (P=۰/۰۰۰) (جدول ٥)، یعنی بر میانگین قطر هاله عدم رشد تأثیرگذار است.

1- *D. aitchisonii*

جدول ۵- آنالیز واریانس دو طرفه قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف.

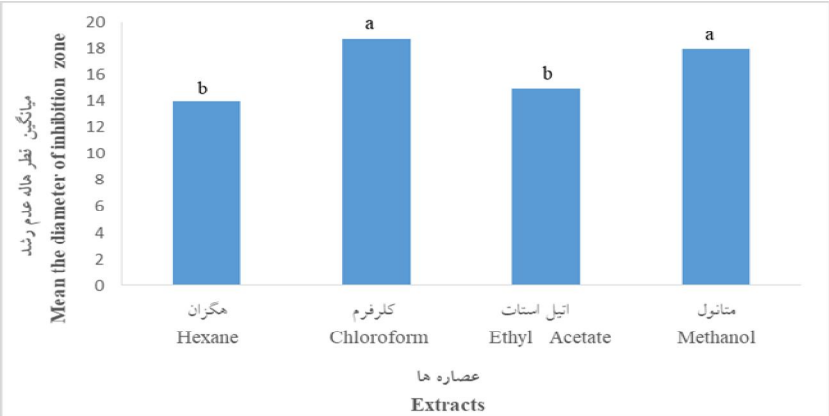
Table 5. Analysis of variance two way of the diameter of inhibition zone the extracts at different concentrations.

منبع Source	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی Degrees of freedom	مقدار F F value	مقدار معنی‌دار Significant value
عصاره Extracts	1819.79	7	117.69	0.0000
غلظت Concentration	268.29	3	40.49	0.0000
اثر متقابل Interaction	64.47	21	1.39	0.158
خطا Error	141.37	64		
کل Total	2293.92	95		



شکل ٤- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف.

Fig. 4. Means comparison of the diameter of inhibition zone the extracts at different concentrations.



شکل ۵- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد برای عصاره‌ها.

Fig. 5. Means comparison of the diameter of inhibition zone for extracts.

هم‌چنین با مقایسه میانگین‌ها، عصاره متانولی و کلروفرمی اثر ضد باکتریایی بهتری نسبت به دو عصاره دیگر داشتند، میانگین قطر هاله عدم رشد آن‌ها در مقایسه با میانگین قطر هاله عدم رشد سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر تتراسایکلین که ١٤ میلی‌متر بوده و به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود، بیش‌تر می‌باشد. هم‌چنین در این پژوهش مشاهده شد که تأثیر نهایی عصاره‌ها روی سویه باکتریایی مورد بررسی وابسته به مقدار عصاره می‌باشد. یعنی با کاهش میزان عصاره اثر ضد باکتریایی کاهش یافته است. برای اسانس، باکتری‌های مورد استفاده (با روش دیسک دیفیوژن) نسبت به تمامی غلظت‌های اسانس فاقد هاله عدم رشد بوده، در نتیجه مقاوم در برابر اسانس بودند.

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها روی باکتری مورد بررسی به روش میکرودایلوشن براث، در (جدول ٦) آمده است.

جدول ٦- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت میکروب‌کشی (MBC) عصاره‌ها علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*.

Table 6. Minimum inhibition concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts against the *S.aureous* bacteria.

عصاره‌ها Extracts	MIC(µg/ml)	MBC(µg/ml)
متانول Methanol	31.25	62.50
کلروفرم Chloroform	62.50	62.50
اتیل استات Ethyl Acetate	500	500
هگزان Hexane	500	1000

نتایج نشان می‌دهد که تمام عصاره‌ها در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* فعال هستند و سطوح مختلف فعالیت ضد باکتری را از خود نشان می‌دهند. MIC عصاره‌ها در محدوده غلظت ۵۰۰ – ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MBC آن‌ها در محدوده ۱۰۰۰ – ٦٢/٥٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، که عصاره متانول و کلروفرم صمغ گیاه وشا در برابر باکتری مذکور دارای فعالیت ضد باکتری قوی‌تری نسبت به دو عصاره دیگر بودند. این در حالی است که مطالعات قبلی مربوط به فعالیت ضد باکتری عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاه، فعالیت ضد باکتری علیه *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوک اورئوس* نشان می داد (۲۵).

هم‌چنین راجانی و همکاران (۲۰۰۲)، فعالیت ضد باکتریایی عصاره (۱:۱) دی کلرومتان – متانول، صمغ گیاه *دورما آمونیکوم* را بر علیه ۷ باکتری گرم مثبت و ۱ باکتری گرم منفی گزارش کردند که دارای حداقل غلظت مهاری برابر با ٤٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۲۳)، که به‌میزان حداقل غلظت مهاری عصاره متانول (۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی در این پروژه نزدیک می‌باشد. در بررسی دیگر دلنوازی و همکاران، فعالیت‌های ضد باکتریایی

عصاره‌های ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاه *دورما آمونیکوم* را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های اتیل استات، کلروفرم و هگزان از ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی اثرات ضد باکتری علیه *استافیلوکوک اورئوس* با MIC برابر با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارد، در حالی‌که عصاره متانولی هیچ فعالیت ضد باکتریایی از خود نشان نشان نداده است (۳). که احتمال زیاد تفاوت در ساختار ترکیبات اندامهای موردنظر در نتایج حاصله مؤثر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهند که خواص زیست‌شناختی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های مختلف صمغ استخراج شده از گیاه با حلال‌های دارای قطبیت متفاوت (هگزان، کلروفرم، اتیل استات و متانولی) می‌توانند تغییر کنند، به گونه‌ای که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتیل استات با $IC_{50} = 69.0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای صمغ این گیاه بود. و اسانس صمغ با $IC_{50} = 166.0$ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسطی می‌باشد. هم‌چنین میزان حداقل غلظت مهاری (MIC) در برابر باکتری‌ها برای عصاره‌های متانولی (۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کلروفرمیک (۶۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتری خوب صمغ گیاه می‌باشد.

منابع

1. Adhami, H.R., Lutz, J., Kählig, H., Zehl, M. and Krenn, L. 2013. Compounds from gum ammoniacum with acetylcholinesterase inhibitory activity. Sci. Pharm. 81: 3. 793-806.
2. Celiktas, O.Y., Kocabas, E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T. and Baser, K. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus* officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 100: 2. 553-559.
3. Delnavazi, M.R., Tavakoli, S., Rustaie, A., Batooli, H. and Yassa, N. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils and extracts of *Dorema ammoniacum* roots and aerial parts. Res. J. Pharmacogn. 1: 4. 11-18.
4. Ghasemi, F., Tamadon, H., Hosseinmardi, N. and Janahmadi, M. 2018. Effects of *Dorema ammoniacum* Gum on Neuronal Epileptiform Activity-Induced by Pentylenetetrazole. Iran. J. Pharm. Res. 17: 2. 735.
5. Haghiroalsadat, F., Vahidi, A., Sabour, M., Azimzadeh, M., Kalantar, M. and Sharafadini, M. 2011. The indigenous *Cuminum cyminum* L. of yazd province: chemical assessment and evaluation of its antioxidant effects. SSU− J. 19: 4. 472-481.
6. Hamburger, M. and Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry. 30: 12. 3864-3874.
7. Inouye, S., Takizawa, T. and Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J. Antimicrob. Chemother. 47: 5. 565-573.
8. Iranshahi, M., Shaki, F., Mashlab, A., Porzel, A. and Wessjohann, L.A. 2007. Kopetdaghins a− E, sesquiterpene derivatives from the aerial parts and the roots of *Dorema* kopetdaghense. J. Nat. Prod. 70: 8. 1240-1243.
9. Irvani, N., Solouki, M., Omidi, M., Zare, A.R. and Shahnazi, S. 2010. Callus induction and plant regeneration in *Dorem ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 100: 3. 293-299.

10.Jaimand, K. and Rezaee, M.B. 2006. Essentional oils, Distillations apparatuses, test methods of essential oils and retention indices in essential oil analysis. Iranian Medicinal Plants society. Tehran. (In Persian)
11.Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. and Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem. 94: 4. 550-557.
12.Khanahmadi, M., Miraghaee, S. and Karimi, I. 2012. Evaluation of the Antioxidant and antimicrobial Properties of *Dorema aucheri* plant. Iran. Red Crescent Med. J. 14: 10. 684-685.
13.Khanavi, M., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A., Masoudi, S. and Rustaiyan, A. 2003. Chemical composition of the essential oil of Stachys byzanthin C. Koch. from Iran. J. Essent. Oil Res. 15: 2. 77-78.
14.Mahon, C.R. and Manuselis, G. eds. 2000. Textbook of diagnostic microbiology (Vol. 355). WB Saunders company. Philadelphia. USA.
15.Manjamalai, A. and Grace, V.M. 2012. Antioxidant activity of essential oils from *Wedelia chinensis* (Osbeck) in vitro and in vivo lung cancer bearing C57BL/6 mice. Asian Pac. J. Cancer Prev. 13: 7. 3065-3071.
16.Masoudi, S., Esmaeili, A., Ali khalilzadeh, M., Rustaiyan, A., Moazami, N., Akhgar, M.R. and Varavipoor, M. 2006. Volatile constituents of *Dorema aucheri* Boiss, Seseli libanotis (L.) WD Koch var. armeniacum Bordz. *and Conium maculatum* L. three *Umbelliferae* herbs growing wild in Iran. Flavour Fragrance J. 21: 5. 801-804.
17.Mobeen, A., Siddiqui, M.A., Quamri, M.A., Itrat, M. and Imran, M. 2018. Therapeutic potential of *Ushaq* (*Dorema ammoniacum* D. Don): a unique drug of unani medicine. Int. J. Unani. Integr. Med. 2: 11-16.
18.Motevalian, M., Mehrzadi, S., Ahadi, S. and Shojaii, A. 2017. Anticonvulsant activity of *Dorema ammoniacum* gum: evidence for the involvement of benzodiazepines and opioid receptors. Res. Pharm. Sci. 12: 1. 53.
19.Mozaffarian, V. 2007. *Flora* of iran (*Umbelliferae* family). Research institute of forests and rangelands. Tehran. (In Persian)
20.Nabavi, S.M., Nabavi, S.F. and Ebrahimzadeh, M.A. 2012. Free radical scavenging and antioxidant activities of *Dorema aitchisonii*. J. Food Drug Anal. 20: 1.
21.Pandpazir, M., Kiani, A., Fakhri, S. and Mousavi, Z. 2018. Anti-Inflammatory effect and skin toxicity of aqueous extract of *Dorema ammoniacum* gum in experimental animals. Res. J. Pharmacogn. 5: 4. 1-8.
22.Plazas, E.A., Avila, M.C., Delgado, W.A., Patino, O.J. and Cuca, L.E. 2018. In vitro antioxidant and anticholinesterase activities of *Colombian* plants as potential neuroprotective agents. Res. J. Med. Plants. 12: 9-18.
23.Rajani, M., Saxena, N., Ravishankara, M.N., Desai, N. and Padh, H. 2002. Evaluation of the antimicrobial activity of ammoniacum gum from *Dorema ammoniacum*. Pharm. Biol. 40: 7. 534-541.
24.Ravishankara, M.N., Shrivastava, N., Padh, H. and Rajani, M. 2002. Evaluation of antioxidant properties of root bark of Hemidesmus indicus R. Br. (Anantmul). Phytomed. 9: 2. 153-160.
25.Sabahi, M., Mansouri, S.H., Ramezanian, M. and Gholam-Hoseinian, A. 1987. Screening of plants from the southeast of Iran for antimicrobial activity. Int. J. Crude Drug Res. 25: 2. 72-76.
26.Sajjadi, S.E., Ghassemi, N. and Mohamadzamani, P. 2007. Chemical constituents of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. leaf, an Iranian resinous plant. Revue des régions Arides. Pp: 194-196.
27.Shen, T., Li, G.H., Wang, X.N. and Lou, H.X. 2012. The genus Commiphora: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J. Ethnopharmaco. 142: 2. 319-330.

28. Udayashankar, A.C., Nandhini, M., Rajini, S.B. and Prakash, H.S. 2019. Pharmacological significance of medicinal herb eclipta albal-a review. Int. J. Pharm. Sci. Res. 10: 3592-3606.
29. Yousefzadi, M., Heidari, M., Akbarpour, M., Mirjalili, M.H., Zeinali, A. and Parsa, M. 2011. In vitro cytotoxic activity of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. Mid. East J. Sci. Res. 7: 4. 511-4.
30. Yousefzadi, M., Mirjalili, M.H., Alnajar, N.A.B.A., Zeinali, A. and Parsa, M. 2011. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. fruit from Iran. J. Serb. Chem. Soc. 76: 6. 857-863.
31. Zandpour, F., Vahabi, M.R., Allafchian, A.R. and Farhang, H.R. 2016. Phytochemical investigation of the essential oils from the leaf and stem of (*Apiaceae*) in central zagros, Iran. J. Herb. Drugs. 7: 2. 109-116.