



Comparative evaluation of antioxidant and antibacterial activity of *Viola odorata* L. and *Hymenocrater longiflorous* Benth. extracts from the Kosalan region, Kurdistan province

Shahla Hosseini^{1*} and Sajjad Atashi²

1*- Corresponding author. Department of Biological Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, E-mial: Sh.hosseini@uok.ac.ir

2- Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: October 2024

Revised: July 2025

Accepted: August 2025

Abstract

Background and Objective: *Viola odorata* L. and *Hymenocrater longiflorus* Benth., two wild medicinal plants from the Kosalan region of Kurdistan Province, are recognized for their promising health-related effects. *Viola* is the largest genus in the Violaceae family, with 30 out of its 525-600 species identified in Iran. *V. odorata* (sweet violet) is widely used in the perfume industry and contains secondary metabolites with anti-inflammatory, sedative, detoxifying, and antiviral properties. Its various plant parts are known for medicinal uses, and local ecotypes have been documented. *Hymenocrater*, from the Lamiaceae family, includes 24 species found in Iran and neighboring countries; nine are reported in Iran, and *H. longiflorus* has ornamental and medicinal properties. Located in northwestern Iran, including Kosalan, *H. longiflorus* has no dedicated medicinal studies, although the genus exhibits sedative, anti-inflammatory, antispasmodic, and antipyretic activities. Both families are valued for their high antioxidant and phenolic content, driving pharmaceutical interest. This study focuses on assessing the antioxidant capacity, phenolic and flavonoid composition, and antibacterial properties of flower and leaf methanolic extracts from both plants, to highlight their medicinal potential.

Methodology: Plant samples were collected from the Kosalan region, and herbarium samples were prepared. Extraction from the aerial parts (flowers and leaves) was performed using methanol as a solvent. Antioxidant capacity was measured using the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method and DPPH radical activity at different extract concentrations. Additionally, phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu method, and flavonoid content was assessed using the aluminum chloride colorimetric method. The antibacterial properties of the samples were evaluated using disk diffusion and tube dilution methods against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains.

Results: According to the results, the flowers of *H. longiflorus* exhibited the highest reducing power and free radical inhibition ($IC_{50} = 851.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$) compared to the standard Trolox ($IC_{50} = 612.35 \mu\text{g.ml}^{-1}$). The leaves of *V. odorata* contained the highest amount of flavonoids, with 58.21 mg of quercetin per gram of dry extract, while the flowers of this species had the lowest amount of flavonoids (3.37 mg QE/Ex). The phenolic content of the samples ranged from 30 to 33 mg of gallic acid per gram of extract. Antimicrobial tests indicated that the flower extract of *V. odorata* had no effect on the proliferation of the strains, but its leaves created a 7 mm zone of inhibition at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ against *E. coli*. The leaves of *H. longiflorus* exhibited a significant inhibitory effect only on *S. aureus*, while its flowers demonstrated



inhibition against *S. aureus* at all concentrations tested (18 mm). This species also inhibited the growth of *E. coli* at a concentration of 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (13 mm). Results from the tube dilution tests indicated a MIC of 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ and MBC of 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ for the flowers and leaves of *H. longiflorus* against *S. aureus*, and a MIC of 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ for *E. coli*. The flower extract of *V. odorata* was ineffective against both strains, while its leaf extract confirmed a MIC of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The results of this test were consistent with the antibiogram test. GC analysis confirmed the presence of terpenoids, sesquiterpenoids, alkaloids, sugars, and esters in these species, suggesting potential antidiabetic and anticancer properties.

Conclusion: This study concludes that the flower methanolic extract of *H. longiflorus* has significant antioxidant and antimicrobial activities. These findings highlight the potential of this species as a source of natural antioxidants and antimicrobial agents, which could be utilized in food preservation, pharmaceuticals, and natural product-based industries. Further research is required to isolate and identify the specific bioactive compounds responsible for these effects.

Keywords: antioxidant activity, antibacterial effects, DPPH radical scavenging, FRAP assay, phenolic and flavonoid content.

مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره گونه‌های *Hymenocrater longiflorous* و *Viola odorata* L. Benth. از منطقه کوسالان استان کردستان

شهلا حسینی^{۱*} و سجاد آتشی^۲

*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، پست الکترونیک: Sh.hosseini@uok.ac.ir

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۳

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۴

چکیده

سابقه و هدف: گونه‌های *Hymenocrater longiflorous* و *Viola odorata* از گیاهان خودرو منطقه کوسالان در استان کردستان هستند که به دلیل اثرهای دارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند. *Viola* بزرگ‌ترین جنس خانواده بنفشه‌ایان است و شامل ۵۲۵ تا ۶۰۰ گونه در سراسر جهان می‌باشد که ۳۰ گونه آن در ایران شناسایی شده‌اند. *V. odorata* یا بنفشه معطر، در صنعت عطرسازی کاربرد دارد و متابولیت‌های ثانویه آن خواص ضدالتهابی، آرام‌بخش، ضد سم و ضد ویروس دارند. بخش‌های مختلف این گیاه از جمله گل، برگ، ریشه و بذر مصارف دارویی دارند و اکوتیپ‌های آن در منطقه کوسالان مطالعه شده‌اند. جنس *Hymenocrater* از خانواده نعناعیان شامل ۲۴ گونه است که در ایران و کشورهای همسایه توزیع شده‌اند. از این میان، ۹ گونه در ایران گزارش شده و *H. longiflorous* به‌عنوان گیاهی زینتی و دارویی شناخته می‌شود. این گونه در کوه‌های شمال غرب ایران، از جمله کوسالان وجود دارد. اگرچه مطالعات خاصی درباره خواص دارویی آن وجود ندارد، اما جنس *Hymenocrater* به‌دلیل اثرهای آرام‌بخشی، ضدالتهابی، ضداسپاسم و کاهش تب مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و محتوای فنولی خانواده‌های بنفشه‌ایان و نعناعیان، بسیاری از گونه‌های آنها در صنعت دارو کاربرد دارند. این مطالعه به بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و اثر مهار عصاره متانولی گل‌ها و برگ‌های *V. odorata* و *H. longiflorous* بر سویه‌های باکتریایی گرم مثبت و منفی می‌پردازد تا ظرفیت دارویی این گیاهان مشخص شود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های گیاهی از منطقه کوسالان جمع‌آوری و نمونه هرباریومی از آنها تهیه شد. عصاره‌گیری از اندام‌های هوایی (گل و برگ) با حلال متانول انجام شد. توان آنتی‌اکسیدانی با روش احیای آهن (FRAP) و مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف سنجیده شد. همچنین محتوای فنولی به روش فولین-سیوکالتیو و محتوای فلاونوئیدی به روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری گردید. خواص ضدباکتریایی عصاره نمونه‌ها نیز، با استفاده از روش‌های انتشار دیسک و رقت لوله‌ای در مقابل سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی باکتریایی ارزیابی شد.

نتایج: براساس این تحقیق، گل گونه *H. longiflorous* بیشترین قدرت احیاکنندگی و مهار رادیکال آزاد ($IC_{50} = 851/4 \mu g.ml^{-1}$) نسبت به ترکیب استاندارد ترولاکس ($612/35 \mu g.ml^{-1}$) را دارد. برگ *V. odorata* با $58/21$ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره خشک، بیشترین مقدار فلاونوئید را داشت و گل این گونه کمترین مقدار ($37/3 mg QE/Ex$) را دارا بود. محتوای فنل نمونه‌ها بین ۳۰ تا ۳۳ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره متغیر بود. آزمایش‌های ضد میکروبی نشان داد که عصاره گل *V. odorata* تأثیری بر تکثیر سویه‌ها نداشت، اما برگ آن در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هاله عدم رشد ۷ میلی‌متر در محیط کشت *E. coli* ایجاد کرد. برگ *H. longiflorous* تنها روی سویه *S. aureus* اثر مهاری داشت و گل آن در تمام غلظت‌ها اثر مهاری روی سویه *S. aureus* (۱۸ میلی‌متر) اعمال کرد. این گونه در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز رشد سویه *E. coli* را مهار کرد (۱۳ میلی‌متر). نتایج آزمون رقت لوله‌ای، $MIC_{25} \mu g.ml^{-1}$ و $MBC 50 \mu g.ml^{-1}$ را برای گل و برگ *H. longiflorous* در برابر سویه *S. aureus* و $MIC_{200} \mu g.ml^{-1}$ برای سویه *E. coli* نشان داد. عصاره گل *V. odorata* بر روی هر دو سویه بی‌تأثیر بود. اما عصاره برگ آن

MIC $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$ را تأیید کرد. نتایج این آزمایش با آزمون آنتی‌بیوگرام همخوانی داشت. تحلیل GC، ترکیب‌های ترپنوئید، سزکویی ترپنوئید، آلکالوئید، قند و استر را در این گونه‌ها تأیید کرد که خاصیت ضد دیابتی و ضد سرطانی برای آنها پیش‌بینی می‌شود. نتیجه‌گیری: این مطالعه نتیجه‌گیری می‌کند که عصاره گل *H. longiflorous* دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجهی است. این یافته‌ها ظرفیت این گونه را به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی و عامل ضد میکروبی برجسته می‌کند، که می‌تواند در نگهداری مواد غذایی، داروسازی و صنایع مبتنی بر محصولات طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. البته تحقیقات بیشتری برای جداسازی و شناسایی ترکیب‌های زیرفعال خاص مسئول این اثرها مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اثرهای ضدباکتریایی، مهار رادیکال DPPH، سنجش FRAP، محتوای فنولی و فلاونوئیدی.

مقدمه

گیاهان از گذشته تاکنون به عنوان یکی از اصلی‌ترین منابع درمانی، مورد استفاده قرار گرفته‌اند و نقش مهمی در سیستم‌های بهداشتی سنتی و مدرن ایفا کرده‌اند. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، حدود ۸۰ درصد از جمعیت جهان همچنان برای نیازهای بهداشتی خود به داروهای گیاهی و طب سنتی وابسته هستند (Joharchi & Amiri, 2012).

آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی، ترکیب‌هایی طبیعی مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها و کاروتنوئیدها هستند که با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. این ترکیب‌ها نقشی حیاتی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن و بهبود سلامت انسان دارند (Palma et al., 2023). علاوه بر این، عصاره‌های گیاهی به دلیل خواص ضد باکتریایی خود مورد توجه قرار گرفته‌اند. شواهد متعددی نشان می‌دهند که این عصاره‌ها می‌توانند در مهار رشد میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها مؤثر باشند (Zaynab et al., 2018).

گونه *Viola odorata* L. از شاخه نهان‌دانگان دولپه، راسته Malpighiales و خانواده Vilolaceae (بنفشگان) است. جنس *Viola* بومی اروپا و آسیا بوده و بزرگ‌ترین جنس از خانواده بنفشه می‌باشد که ۵۲۵-۶۰۰ گونه از این جنس در دنیا وجود دارد. حدود ۳۰ گونه از این جنس در شمال و شمال غرب ایران شناسایی شده است که

۱۹ گونه از آنها بومی ایران محسوب می‌شود. مهمترین گونه‌های دارویی جنس *Viola*، *V. tricolor*، *V. arvensis*، *V. baoshanensis* و *V. odorata* است. گونه‌های این جنس، علفی و بوته‌ای، پایا و چندساله می‌باشند. برگ‌های آن قلبی شکل و دارای دم‌برگ درازی می‌باشد که از محل مشترکی در ناحیه یقه گیاه (تقریباً هم‌سطح با زمین) خارج می‌شوند. این گیاه در اواخر زمستان و اوایل بهار گل می‌دهد (Abolghasemi et al., 2020). *Viola odorata* به نام محلی بنفشه معطر (کردی: وه نه و شه) هم شناخته می‌شود. از گل‌ها، برگ‌ها، ریشه‌ها، دانه‌ها و حتی قسمت‌های کامل این گل برای مصارف دارویی استفاده شده است. این گونه حاوی روغن فرار، رنگ‌دانه، متیل سالیسیلات، گلیکوزید و آنتوسیانین است (Vishal et al., 2009). با وجود گزارش‌های متعددی از تأثیرات دارویی این گونه، مقایسه خواص زیستی اندام‌های رویشی و زایشی آن تاکنون انجام نشده است و با توجه به اینکه شرایط اکولوژیکی می‌تواند در تنوع و غلظت متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار باشد، از این رو اکوتیپ‌هایی از این گونه از منطقه کوهستانی کوسالان مورد مطالعه قرار گرفته است.

Hymenocrater نیز یکی از جنس‌های خانواده Lamiaceae (نعناعیان) است که در دنیا ۲۴ گونه دارد و در ایران، افغانستان، ترکمنستان، پاکستان، ترکیه و عراق پراکنش دارند. ۹ گونه از این جنس در فلور ایران گزارش شده است (Sabet Teimouri et al., 2016). گونه

هدف مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و اثر عصاره‌های متانولی گل‌ها و برگ‌های دو گونه *H. longiflorous* و *V. odorata* بر مهار رشد سویه‌های باکتریایی گرم مثبت و منفی طراحی شده است. این پژوهش با تکیه بر شرایط اکولوژیکی منطقه کوسالان در استان کردستان، تلاش می‌کند تا اطلاعاتی جامع در مورد ظرفیت زیستی این گیاهان ارائه دهد و نقش آنها را در توسعه کاربردهای دارویی و زیستی روشن نماید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و عصاره‌گیری

گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش در فصل بهار سال ۱۴۰۱ از منطقه کوسالان استان کردستان جمع‌آوری شدند (شکل ۱) و به صورت نمونه هرباریومی تهیه شده و در مخزن هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه کردستان نگهداری می‌شود. مشخصات کامل مربوط به گونه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. نمونه‌های گیاهی (گل و برگ) در شرایطی دور از نور و حرارت مستقیم، خشک و آسیاب شدند.

به ازای هر گرم از نمونه آسیاب شده، ۱۰ میلی‌لیتر متانول به عنوان حلال، به نمونه‌ها اضافه و در دمای اتاق بر روی شیکر به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. عصاره‌ها با کاغذ واتمن ۴۲ صاف شده و حلال آنها با استفاده از دستگاه روتاری مجهز به پمپ خلأ جدا شد. سپس عصاره‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری گردید.

Hymenocrater longiflorous Benth با نام محلی کردی «سووره هه لاله» و فارسی «گل اروانه» در گروه گیاهان زینتی و دارویی طبقه‌بندی می‌شود (Mozaffarian, 1996). این گیاه در ارتفاعات شمال غرب ایران از جمله منطقه کوسالان وجود دارد. گونه‌های جنس *Hymenocrater* درختچه‌های کوتاه یا گیاهان چندساله علفی با انشعابات زیاد ساقه، بدون کرک یا کرک‌دار، برگ‌ها بدون دم‌برگ یا دم‌برگ‌دار در قاعده بریده یا قلبی شکل، نوک‌تیز با حاشیه دندانه‌دار هستند. گل‌آذین در این جنس گرزنی با کاسه گل قیفی تا استوانه‌ای است. گونه *H. longiflorous* گیاهی معطر، چندساله و پایا است که به صورت بوته‌ای با ارتفاع ۲۰-۶۰ سانتی متری مشاهده می‌شود. در این گونه پرچم‌های گل، بلند و از آن بیرون زده‌اند (Jamzad, 2012). خاصیت دارویی مشخصی برای گونه *H. longiflorous* گزارش نشده است، این گونه نزد مردم محلی به دلیل عطر و بوی خاص آن مطلوب است و استفاده خوراکی از آن گزارش نشده است. با وجود این، در منابع گذشته ایران خواص درمانی از جمله به عنوان تقویت‌کننده قلب، آرام‌بخش و تسکین‌دهنده درد برای جنس *Hymenocrater* گزارش شده است. همچنین اثرهای درمانی دیگری از جمله ضد التهاب بودن، ضد اسپاسم و ضد نفخ بودن، پایین آورنده تب و رفع‌کننده علائم سرماخوردگی نیز در گزارش‌ها آمده است. امروزه نیز از فراورده‌های مختلف گونه‌های این جنس از جمله اسانس آن به عنوان طعم‌دهنده، نگهدارنده و آنتی‌اکسیدان در صنایع غذایی و داروسازی استفاده می‌شود (Asaadi & Khoshnod Yazdi, 2018). این مطالعه با



شکل ۱- گونه‌های *Viola odorata* (A و B) و *Hymenocrater longiflorus* (C) در زیستگاه طبیعی آنها از منطقه کوسالان، استان کردستان

Figure 1. *Viola odorata* (A and B) and *Hymenocrater longiflorus* (C) in their natural habitats from Kosalan region, Kurdistan province, Iran

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه

Table 1. Specifications of the studied samples

Plant family	Species scientific name	Local name (Kurdish)	Local name (Persian)	Latitude and longitude	Herbarium specimen code
Violaceae	<i>Viola odorata</i>	Vanawsha	Banafshe moatar	35°14'09"N 46°22'49"E	UOK-201
Lamiaceae	<i>Hymenocrater longiflorus</i>	Soora halala	Gole arvaneh	35°12'51"N 46°27'18"E	UOK-204

شد. نمونه‌ها در 12000 r.min^{-1} به مدت ۱۰ دقیقه سائتریفوژ شدند. از مایع رویی حاصل، مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر جدا و با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر FeCl_3 ۰/۱ درصد ترکیب شد. قرائت جذب در ۷۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis Elico SL ۱۶۴ انجام شد. از غلظت‌های ۲۵ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید اسکوربیک به عنوان کنترل مثبت در سه تکرار استفاده شد و میانگین نتایج متعاقباً محاسبه گردید.

سنجش توان آنتی‌اکسیدانی با روش احیای آهن توان کاهشی عصاره براساس روش Chen و Yen (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، مقادیر ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های نمونه در غلظت‌های مختلف با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (0.2 mol.l^{-1} ، pH ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر از $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ۱٪ ترکیب شدند. پس از یک دوره انکوباسیون ۲۰ دقیقه‌ای در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط وارد

همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. نیم میلی لیتر از محلول پایه (یک میلی گرم عصاره در یک میلی لیتر DMSO)، با ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪)، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم (یک مولار) و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به خوبی مخلوط شد. سپس، مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط به حال سکون باقی ماند تا واکنش های لازم رخ دهد. آنگاه، جذب محلول رویی در طول موج ۴۱۵ نانومتر ثبت شد. وجود رنگ زرد در مخلوط واکنش، نشان دهنده حضور فلاونوئیدها بود. برای رسم منحنی کالبراسیون استاندارد از کوئرستین استفاده شد و نتایج به صورت میلی گرم کوئرستین / گرم عصاره به دست آمد.

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی روش دیسک دیفیوژن

در ابتدا، دو سویه باکتریایی (استافیلوکوکوس اورئوس، گرم مثبت و اشرشیا کولی، گرم منفی) هریک با غلظت 10^6 cfu.ml^{-1} ، با استفاده از سواب های استریل روی پلیت های آگار مولر-هینتون کشت داده شدند. پس از آن، دیسک های کاغذی به قطر شش میلی متر با ۲۵ میکرولیتر از محلول های مختلف عصاره (از هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم / میلی لیتر) آغشته و روی سطح آگار قرار داده شدند. دیسک های آنتی بیوتیک پنی سیلین و جنتامایسین (۳۰ میکروگرم) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. از DMSO خالص به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، هاله های عدم رشد روی پلیت ها با استفاده از خط کش اندازه گیری گردید.

روش رقت لوله ای برای تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

حداقل غلظت مهاري رشد و حداقل غلظت باکتری کشی با استفاده از روش رقیق سازی و با استفاده از محیط کشت تریپتون سوی برات (TSB) انجام شد. حجمی برابر ۹۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع تریپتون سوی برات، حاوی محلول هایی با غلظت معین، با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

سنجش توان آنتی اکسیدانی با روش رادیکال DPPH

برای ارزیابی فعالیت مهار رادیکال DPPH نمونه، یک محلول ۱ میلی لیتری DPPH با غلظت ۰/۱ میلی مولار در لیتر در متانول با ۰/۳ میلی لیتر از عصاره در غلظت های مختلف (۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مخلوط شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شد. پس از انکوباسیون، جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری گردید (Bondet et al., 1997). فعالیت مهاري که به صورت درصد بازدارندگی ($I\%$) نمایش داده می شود، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$I\% = [(OD \text{ کنترل} - OD \text{ نمونه}) / OD \text{ کنترل}] \times 100$$

درصد مهار بالاتر نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی قوی تر عصاره است که با خنثی سازی مؤثر رادیکال DPPH نشان داده می شود. در این آزمایش محلول ترولوکس به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش محتوای فنول تام عصاره ها

ارزیابی محتوای فنولی عصاره ها به روش فولین سیوکالتیو انجام شد (Aiyegoro & Okoh, 2010). به این طریق که هر میلی گرم از هر عصاره در ۱۰ میلی لیتر متانول حل شد و به هریک ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتیو اضافه و به مدت ۲ دقیقه هم زده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر محلول سدیم کربنات ۷٪ به آنها اضافه گردید و در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار گرفت. نهایتاً جذب آنها با دستگاه اسپکتوفتومتر در ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک، محلول پایه ای با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اسید گالیک تهیه شد و از آن غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید و جذب نمونه ها در ۷۶۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش محتوای فلاونوئید تام عصاره ها

کمی سازی فلاونوئید عصاره ها براساس روش Chang و

اسید اسکوربیک (به غیر از غلظت ۰/۸) (۵۸٪) نشان داد (شکل ۲A). ترتیب توان احیای آهن در عصاره نمونه‌های مطالعه شده اینگونه بود: $V. odorata$ (flower) > $H. longiflorus$ (Leaf) > $V. odorata$ (leaf) > $H. longiflorus$ (flower). آنالیز واریانس داده‌ها اختلاف معنی‌دار میانگین توان احیایی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی در قیاس با اسید اسکوربیک در سطح اطمینان ۰/۰۵ را تأیید کرد (جدول ۲). نتیجه آزمون تعقیبی داده‌ها نیز اختلاف معنی‌دار میانگین تمام نمونه‌ها به غیر از برگ $H. longiflorus$ با گل $V. odorata$ (Significancy = 0.608) و گل $H. longiflorus$ با اسید اسکوربیک (Significancy = 1) را در سطح اطمینان ۰/۰۵ تأیید کرد.

نتایج سنجش توان آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال DPPH نیز با روش قبل مطابقت داشت (شکل B ۲). در این آزمایش رادیکال DPPH با ترکیب آنتی‌اکسیدانی واکنش می‌دهد و طی آن الکترون آزاد خود را از دست داده و رنگ بنفش آن به زرد تبدیل می‌شود. اندازه‌گیری میزان این تغییر رنگ از طریق جذب آن نشان داد که همانند آزمایش قبلی گل در گونه $H. longiflorus$ بیشترین تغییر رنگ را نشان داده است. ترتیب درصد مهار رادیکال آزاد در نمونه‌های مورد مطالعه به این گونه است.

$V. > H. longiflorus$ (Leaf) > $V. odorata$ (leaf)

$H. longiflorus$ (flower) > $odorata$ (flower)

تفاوت در ترتیب گونه‌ها در آزمون‌های توان احیای آهن (FRAP) و مهار رادیکال آزاد (DPPH) می‌تواند به عوامل متعددی مرتبط باشد. ازجمله سازوکار عملکرد متفاوت در روش‌های آزمون FRAP، میزان توانایی نمونه‌ها در احیای یون‌های آهن Fe^{3+} به Fe^{2+} است که بستگی به توان احیاکنندگی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی دارد. این توان به‌طور خاص به ترکیب‌هایی مانند فلاونوئیدها و ترکیب‌های فنلی مرتبط است که گروه‌های عاملی مانند OH- آنها قادر به احیای آهن هستند. روش مهار رادیکال DPPH بر پایه انتقال الکترون یا اهدای هیدروژن به رادیکال‌های آزاد DPPH است که منجر به خنثی‌سازی این رادیکال‌ها

کشت میکروب ترکیب شد. این مخلوط سپس از چاهک اول تحت رقیق‌سازی سریالی قرار گرفت. استاندارد نیمه مک‌فارلند برای ایجاد کدورتی برابر با سوسپانسیون باکتری با غلظت $10^8 \times 0.5$ cfu.ml⁻¹ استفاده شد. لوله‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتوری با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. آخرین میکروتیوبی که در آن رشد باکتری و کدورت مشاهده نشد و حاوی عصاره‌ها بود، به عنوان لوله حاوی حداقل غلظت مهار رشد (MIC) گزارش شد. برای تعیین MBC، دو چاهک بعد از MIC، انتخاب و در محیط تریپتون سوی آگار کشت داده شد. عدم رشد پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نشان‌دهنده MBC بود.

تجزیه آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها، برای مقایسه نتایج داده‌های حاصل از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی و آزمون محتوای فنل و فلاونوئید و آزمون ضد میکروبی اندام‌های هوایی دو گونه مورد نظر و بررسی معنی‌دار بودن یا نبودن متغیرها از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شد. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، آزمون همگون بودن واریانس‌ها با آزمون Levene's Test انجام شد. در مواردی که تفاوت معنی‌دار مشاهده شد، آزمون مقایسه‌ای توکی برای تعیین اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه سه بار تکرار شد و مقادیر به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید. داده‌ها با دو نرم‌افزار SPSS ۱۶ و EXCEL آنالیز شدند.

نتایج

فعالیت آنتی‌اکسیدانی برون تنی

نتایج ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی با روش احیای آهن نشان داد که از بین اندام‌های گل و برگ دو گونه $H. longiflorus$ و $V. odorata$ ، نمونه گل از گونه $H. longiflorus$ درصد توان احیایی بالاتری (۵۵٪) را در تمامی غلظت‌ها نسبت به گونه‌های دیگر و حتی نسبت به

آنتی اکسیدانی ترکیب‌های مختلف تأثیر بگذارد و نتایج روش‌ها را تغییر دهد.

تجزیه واریانس داده‌ها برای مقایسه میانگین فاکتورهای گیاه و غلظت و ارتباط متقابل آنها انجام شد. نتایج نشان داد که در تمام سطوح مقایسه تفاوت معنی‌داری بین درصد توان مهار رادیکال آزاد چه در بین گیاهان در مقایسه با ترولاکس و چه در غلظت‌های متفاوت، وجود دارد (جدول ۳). البته اختلاف معنی‌دار داده‌ها در سطح اطمینان ۰/۰۵ بوده است. نتیجه آزمون تعقیبی به روش توکی نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین توان مهار برگ گونه‌های مورد مطالعه وجود ندارد ولی بین برگ و نمونه‌های گل گونه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. توان مهار گل گونه‌ها و استاندارد ترولوکس در تمام غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار را نشان داد. با استفاده از داده‌های درصد مهار عصاره‌ها نمودار رگرسیون آنها رسم شد و با استفاده از رابطه خط به دست آمده میزان IC_{50} به دست آمد (جدول ۴).

می‌شود. ترکیب‌های مختلفی می‌توانند این فرایند را تسریع کنند، از جمله فلاونوئیدها، فنول‌ها و حتی ترکیب‌های غیرقطبی. این تفاوت همچنین ممکن است تحت تأثیر ترکیب شیمیایی متفاوت اجزای گیاهان قرار گرفته باشد و اینکه اثر ماتریس پیچیده نمونه‌های گیاهی می‌تواند بر دسترسی‌پذیری و فعالیت بیولوژیکی ترکیب‌ها تأثیر بگذارد. ترکیب‌های آنتی اکسیدانی در بافت‌های مختلف گیاه ممکن است توسط ماتریس متفاوتی احاطه شده باشند که عملکردشان را در روش‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهد و احتمال اینکه هریک از روش‌های مورد استفاده به نوع خاصی از ترکیب‌ها حساسیت داشته باشند نیز وجود دارد. مثلاً روش FRAP به ترکیب‌هایی حساس‌تر است که به‌طور مستقیم توانایی احیای یون‌های فلزی را دارند و DPPH نسبت به ترکیب‌هایی حساس‌تر است که به راحتی اتم هیدروژن یا الکترون آزاد می‌کنند. البته یادآوری می‌شود که تفاوت در شرایط محیطی مانند (pH) یا روش آماده‌سازی عصاره‌ها می‌تواند بر فعالیت

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت عصاره‌های متانولی گل‌ها و برگ‌های گیاهان *Viola odorata* و *Hymenocrater longiflorous*

بر قدرت کاهندگی عصاره‌ها با روش FRAP

Table 2. ANOVA of methanol extracts concentration from *Viola odorata* and *Hymenocrater longiflorous* flowers or leaves effects on extracts reducing power using FRAP method

S.O.V.	d.f.	M.S.
Plant (P)	4	3.537**
Extract concentration (E)	5	1.703**
P × E	20	0.141**
Experimental error	60	0.008
C.V. (%)	—	4.47

** : significant at $p < 0.05$

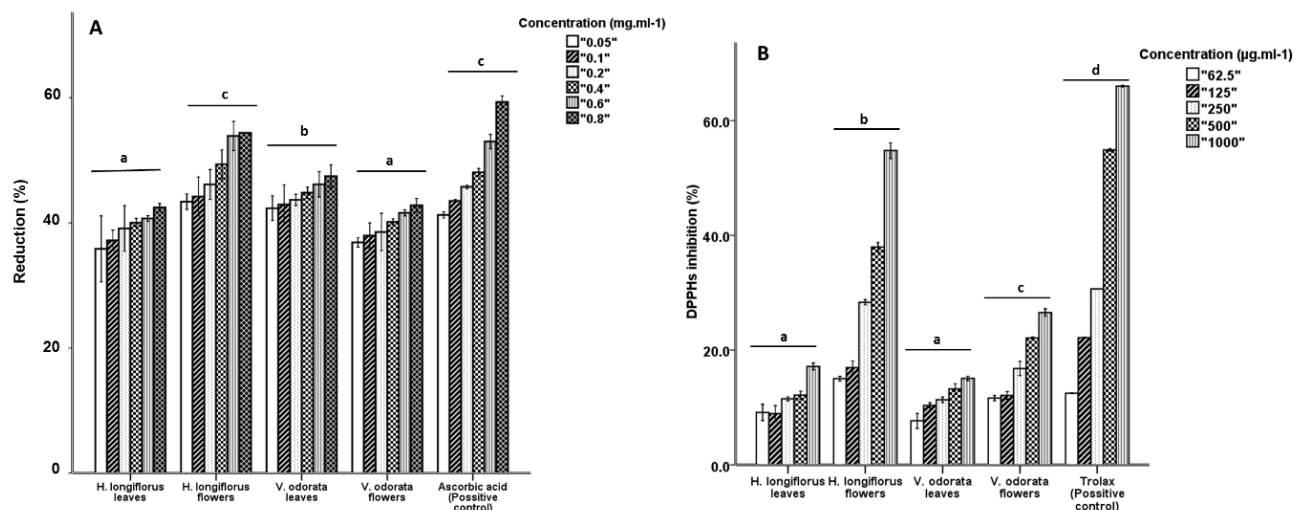
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت عصاره‌های متانولی گل‌ها و برگ‌های گونه‌های *Viola odorata* و *Hymenocrater*

longiflorous بر درصد مهار رادیکال DPPH عصاره‌ها

Table 3. ANOVA of methanol extracts concentration from *Viola odorata* and *Hymenocrater longiflorous* flowers or leaves effects on DPPH radical scavenging percentage of extracts

S.O.V.	d.f.	Mean Square
Plant (P)	4	2015.926**
Extract concentration (E)	4	1554.410**
P × E	16	237.290**
Experimental error	50	0.097
C.V. (%)	—	1.44

** : significant at $p < 0.05$



شکل ۲- مقایسه میانگین A: قدرت احیاء آهن و B: درصد مهار رادیکال DPPH عصاره متانولی گونه‌های *Viola odorata* و *Hymenocrater longiflorus* با A: اسید اسکوربیک و B: ترولکس

Figure 2. Means comparison of A: reducing power and B: DPPH radical inhibition percentage of *Viloa odorata* and *Hymenocrater longiflorus* methanol extracts with A: ascorbic acid and B: Trolox
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Tukey test).

جدول ۴- محتوای فنول کل و فلاونوئید کل، درصد مهار رادیکال DPPH و درصد مؤثر احیای آهن عصاره متانولی گونه‌های *Viola odorata* و *Hymenocrater longiflorus*

Table 4. Total phenols or flavonoids content, DPPH radical inhibition percentage, and effective ferric reducing percentage of *Viloa odorata* and *Hymenocrater longiflorus* methanol extracts

Sample	Total flavonoids (mg QE.g ⁻¹ dry material ± SD)	Total phenols (mg GAE.g ⁻¹ dry material ± SD)	IC ₅₀ (µg.ml ⁻¹) DPPH radical	EC ₅₀ (µg extract.ml ⁻¹) FRAP
<i>Hymenocrater longiflorus</i> flowers	11.46±1.12	33.34± 1.13	5083	400
<i>H. longiflorus</i> leaves	14.91±0.78	30.27± 0.62	851	1300
<i>Viola odorata</i> flowers	3.37± 0.64	33.19± 1.41	2315	1500
<i>V. odorata</i> leaves	21.58±1.54	33.77± 0.43	5932	1100

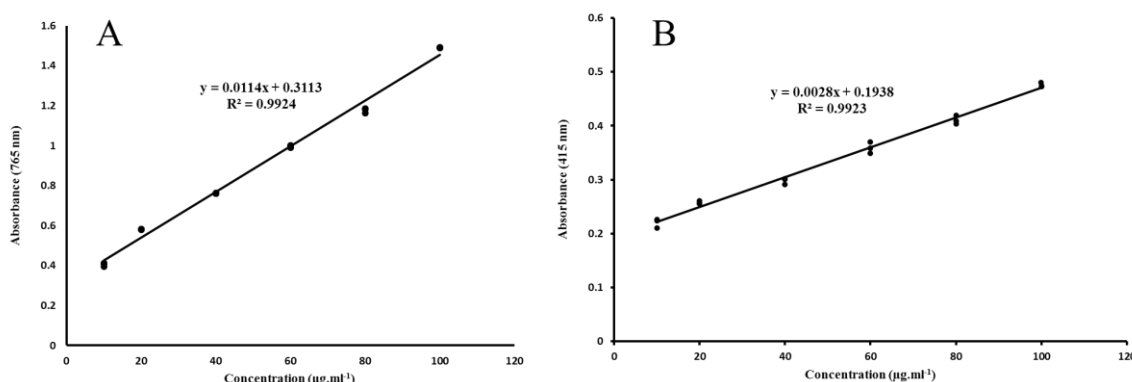
QE: quercetin; GAE; Galic acid; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP: Ferric reducing antioxidant power; IC₅₀: 50% inhibition concentration; EC₅₀: 50% effective concentration

ضریب تعیین (R²) ۰/۹۹۲۴ به دست آمد (شکل ۳A). نتایج نشان داد که محتوای کل فنولیک در میان گونه‌های مختلف متغیر بود اما تفاوت‌های آماری معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۴). ارزیابی محتوای کل فلاونوئید با استفاده از منحنی کالیبراسیون کوئرستین به عنوان استاندارد انجام شد.

محتوای فنول و فلاونوئید کل برای تعیین میزان کل فنول عصاره، معرف فولین-سیوکالتو به عصاره‌های متانولی گیاهان پس از رقیق‌سازی اضافه شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از اسید گالیک به عنوان استاندارد مرجع با رابطه $Y=0.0114x+0.3113$ و

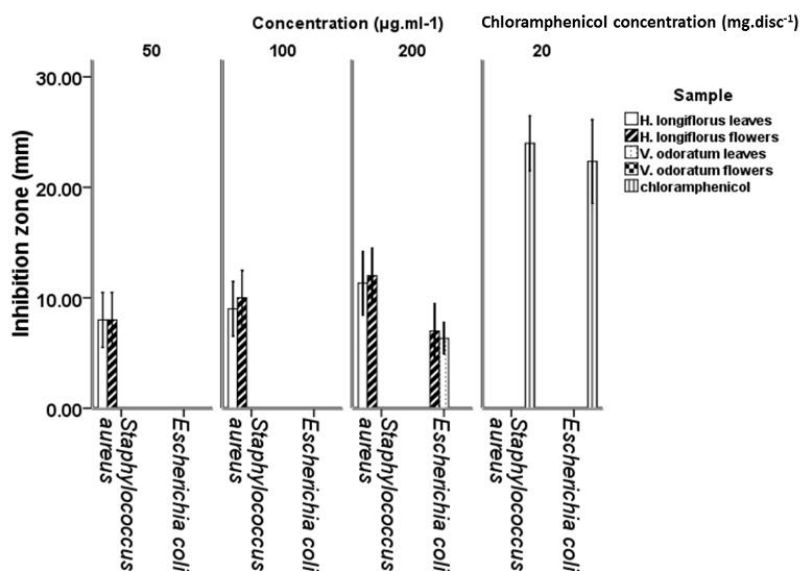
دارد. اگرچه براساس نتایج حاصل و تطبیق آن با دو آزمون آنتی‌اکسیدانی، مشخص شد در نمونه‌های مورد بررسی، ارتباط مشخصی بین محتوای فنل و فلاونوئید، با بالا بودن توان احیایی یا مهار رادیکالی گونه‌های مطالعه شده وجود ندارد.

رابطه منحنی کالیبراسیون $Y=0.0028x+0.1938$ و ضریب تعیین (R^2) ۰/۹۹۲۳ بود (شکل ۳B). نتایج نشان داد که برگ گونه *V. odorata* بیشترین محتوای فلاونوئیدی و گل آن کمترین محتوای فلاونوئیدی را دارد (جدول ۴). آنالیز واریانس مقایسه محتوای فلاونوئید نمونه‌ها، نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین آنها در سطح اطمینان ۰/۰۵ وجود



شکل ۳- منحنی کالیبراسیون A: اسید گالیک و B: کوئرستین

Figure 3. Calibration curve of A: gallic acid and B: quercetin



شکل ۴- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های باکتریایی تحت تأثیر عصاره متانولی گونه‌های *Viola odorata* و

Hymenocrater longiflorus و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکول

Figure 4. Means comparison of bacterial strains inhibition zone diameter affected by *Viloa odorata* and *Hymenocrater longiflorus* methanol extracts and chloramphenicol

آزمایش‌های ضد میکروبی

آزمون آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک

در این آزمایش تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره نمونه‌های مورد مطالعه و حساسیت و مقاومت دو سویه باکتریایی *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت. شاخص این حساسیت وجود هاله عدم رشد در محیط کشت است. این مقادیر با هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک (کنترل مثبت) و (DMSO کنترل منفی) مقایسه شده است (شکل ۴).

براساس نتایج به دست آمده، عدم تأثیرگذاری عصاره مربوط به گل *V. odorata* در تمامی غلظت‌ها در محیط کشت هر دو سویه باکتریایی قابل مشاهده است. برگ این گونه در محیط کشت *S. aureus* فاقد هاله عدم رشد بود و در محیط کشت *E. coli*، منحصراً در غلظت $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$ هاله عدم رشدی به اندازه ۷ میلی‌متر مشاهده شد. عصاره برگ *H. longiflorus* در تمامی غلظت‌ها بر روی *E. coli* بی‌تأثیر بود. اما در تمامی غلظت‌ها بر روی سویه گرم مثبت *S. aureus* توان مهار کنندگی داشت. گل *H. longiflorus* در محیط کشت *E. coli* در غلظت $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$ هاله ۱۳ میلی‌متری ایجاد کرد و در محیط *S. aureus* هاله عدم رشد با قطر ۱۳، ۱۸ و ۹ میلی‌متر به ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیده شد. نتایج به‌دست‌آمده در نمودار شکل ۴ به تفکیک مقایسه هاله عدم

رشد برحسب غلظت، گونه گیاهی و سویه باکتریایی را نشان داده است.

آزمون تعیین MIC و MBC

در این آزمایش حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت باکتری‌کشی برای عصاره نمونه‌ها با روش رقت لوله‌ای اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گل و برگ گونه *H. Longiflorus* توانایی مهار تکثیر و رشد باکتری *S. aureus* را در غلظت‌های پایین‌تر دارد. اگرچه این گونه در غلظت‌های پایین اثر کشندگی و مهاری بر سویه *E. coli* نداشته است و تنها در بالاترین غلظت ($200 \mu\text{g.ml}^{-1}$) توانسته رشد باکتری را مهار کند. گونه *V. odorata* همانند آزمون قبلی عملکرد ضعیفی در مهار رشد و تکثیر باکتری‌ها داشته است و تنها برگ بنفشه توانسته در بالاترین غلظت ($200 \mu\text{g.ml}^{-1}$) تکثیر سویه *S. aureus* را مهار کند (جدول ۵). به دلیل اینکه بیشتر عصاره‌های مورد بررسی در این بخش نتوانستند تأثیر قابل توجهی در مهار رشد باکتری‌ها نشان دهند و تنها عصاره گل و برگ گونه *H. longiflorus* عملکرد نسبتاً خوبی را در این زمینه داشتند، به‌طوری‌که تحلیل آماری تجزیه واریانس برای این بخش انجام نشده است.

جدول ۵- حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی گونه‌های *Viola odorata* و *Hymenocrater longiflorus* در برابر سویه‌های باکتریایی

Table 5. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of *Viloa odorata* and *Hymenocrater longiflorus* methanol extracts against bacterial strains

Sample	Bacterial strain	MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
<i>V. odorata</i> flowers	<i>S. aureus</i>	-	-
<i>V. odorata</i> leaves		200	-
<i>V. odorata</i> flowers	<i>E. coli</i>	-	-
<i>V. odorata</i> leaves		-	-
<i>H. longiflorus</i> flowers	<i>S. aureus</i>	25	50
<i>H. longiflorus</i> leaves		25	50
<i>H. longiflorus</i> flowers	<i>E. coli</i>	200	-
<i>H. longiflorus</i> leaves		200	-

بحث

گیاهان دارویی همواره از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده‌اند و استفاده از آنها پایه طب سنتی ایران و بسیاری از کشورها را تشکیل می‌دهد. این گیاهان در صنعت غذایی و دارویی بیشترین استفاده را دارند. امروزه با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی در حال رشد و توسعه است. شناخت گیاهان دارویی آغازگر راهی برای شناسایی ترکیب‌های طبیعی، طراحی و بعد سنتز ترکیب‌های مشابه با ساختار آنها خواهد بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که گل‌های گونه *H. longiflorus* در هر دو آزمون احیای آهن و مهار رادیکال DPPH بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر نمونه‌ها و حتی نسبت به استانداردهای مورد استفاده دارند. این نتایج با مطالعات قبلی روی گونه‌های مشابه از جنس *Hymenocrater* همخوانی دارد. برای مثال، مطالعات Morteza-Semnani و همکاران (۲۰۱۶) و Al-Anee و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که گونه‌های دیگر از جنس *Hymenocrater* مانند *H. platystegius* و *H. yazdianus* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند که به محتوای فنولی و فلاونوئیدی بالای این گیاهان مرتبط است. نتایج Ahmadi و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان از توان بالای آنتی‌اکسیدانی اسانس این گونه و بالا بودن خواص ضد میکروبی و ضد قارچی آن داشته است. ترکیب‌های مهمی که عمدتاً در اسانس این گونه گزارش شده است شامل مونوترپن‌ها و سزکویی‌ترین‌ها بوده‌اند (Asri et al., 2017).

نتایج این تحقیق نشان داد که برگ‌های گونه *V. odorata* بیشترین محتوای فلاونوئیدی و گل‌های همین گونه کمترین محتوای فلاونوئیدی را داشتند. هرچند، تفاوت‌های آماری معنی‌داری بین محتوای فنولیک نمونه‌ها مشاهده نشد. این یافته‌ها با مطالعات قبلی روی گونه‌های مشابه از جنس *Viola* نیز مطابقت دارد (Kaundal et al., 2022; Moradi et al., 2021).

در زمینه فعالیت ضد میکروبی، این تحقیق نشان داد که گل‌ها و برگ‌های *H. longiflorus* توانایی مهار رشد باکتری

S. aureus را داشتند، در حالی که عصاره‌های *V. odorata* تأثیر ضعیفی بر روی باکتری‌ها نشان دادند. این نتایج با مطالعات قبلی روی جنس *Hymenocrater* مطابقت دارد که نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی قوی عصاره‌های گونه‌های این جنس است (Ahmadi et al., 2010). از سوی دیگر، مطالعات روی جنس *Viola* نشان داده است که عصاره‌های این جنس نیز دارای فعالیت ضد میکروبی هستند، اما تأثیر آنها ممکن است نسبت به گونه‌ها و غلظت‌های مختلف متفاوت باشد. در مقاله مروری Morteza-Semnani و همکاران نیز بر دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد انگلی، ضد سرطانی و ضد دیابتی گونه‌های مختلف جنس *Hymenocrater* اشاره شده است (Morteza-Semnani et al., 2016). همچنین گزارش‌هایی از تأثیرگذاری مثبت گونه *V. tricolor* در برابر میکروارگانیسم‌هایی مانند *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* و *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis* *pneumoniae* که توانسته است رشد و تکثیر آنها را مهار کند، در دست است (Witkowska-Banaszczak et al., 2005; Payez et al., 2022; Doğan et al., 2023). این تفاوت ممکن است به دلیل شرایط محیطی رشد گیاه، تفاوت در متدولوژی‌های استخراج و آزمون، یا ترکیب‌های فعال متفاوت باشد. برای مثال، شرایط محیطی مانند خاک، نور و دما می‌توانند بر میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان اثر بگذارند. همچنین، روش‌های مختلف استخراج (مانند استفاده از حلال‌های متفاوت یا تکنیک‌های حرارتی) می‌توانند به تولید عصاره‌هایی با ترکیب‌های متفاوت منجر شوند. علاوه بر این، تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌های مختلف *Viola* می‌تواند به تولید ترکیب‌های شیمیایی متفاوت منجر شود. گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که گونه‌های مختلف این جنس دارای تنوع گسترده‌ای در میزان و نوع فلاونوئیدها، فنول‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه هستند که می‌تواند توضیح‌دهنده این اختلاف باشد (Kaundal et al., 2022).

مطالعات مشابه نشان داده‌اند که سزکویی‌ترین‌های

آلکالوئیدها مرتبط است. به طور خاص، ترکیب‌هایی مانند پیرولین (پیش‌ساز اسیدهای آمینه) و ترکیب‌های آمین‌دار شناسایی شده‌اند که ممکن است در ایجاد این اثرها نقش داشته باشند. این یافته‌ها با مطالعات قبلی روی جنس *Hymenocrater* همخوانی دارد و ظرفیت بالای این گیاهان را برای استفاده در صنایع دارویی و غذایی به عنوان منابع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل ضد میکروبی نشان می‌دهد. در مقابل، گونه *V. odorata* با وجود داشتن محتوای فلاونوئیدی بالا در برگ‌ها، فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به *H. longiflorus* نشان داد. ترکیب‌های شناسایی شده در این گونه شامل سزکویی‌ترین‌ها، ترکیب‌های آروماتیک هتروسایکلیک و کومارین‌ها است که برخی از آنها ممکن است در فعالیت‌های بیولوژیکی نقش داشته باشند. این یافته‌ها با برخی مطالعات روی جنس *Viola* مطابقت دارد اما تأثیر کمتر مشاهده شده می‌تواند به تفاوت در نوع و ساختار ترکیب‌ها، شرایط محیطی، یا روش‌های استخراج مرتبط باشد. این نتایج نشان می‌دهد اگرچه محتوای کلی فنولی و فلاونوئیدی در فعالیت‌های زیستی گیاهان نقش کلیدی دارند، اما نوع و ترکیب این مواد و حضور ترکیب‌های خاص شیمیایی نیز می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر عملکرد آنها داشته باشد. برای بهره‌برداری بهینه از این گیاهان در صنایع مختلف، تحقیقات بیشتری برای شناسایی دقیق ترکیب‌های مؤثر و سازوکارهای عمل آنها ضروریست.

اکسیژنه، مانند آنچه در گونه *H. incanus* گزارش شده است، دارای اثرهای آنتی‌اکسیدانی قوی هستند (Ghavam et al., 2022). در گونه *V. odorata*، حضور کوماریک اسید و فرولیک اسید (Kaundal et al., 2022) به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده، ممکن است نقش مهمی در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده داشته باشد. گونه *V. odorata* به عنوان یک گونه دارویی در درمان سرماخوردگی، از بین برنده خلط سینه و کاهش دهنده سرفه در شمال غربی هیمالیا مفید بوده است. این می‌تواند تأییدی بر خاصیت ضد باکتریایی این گونه باشد. ترکیب‌هایی مانند مونوترپن‌ها و سزکویی‌ترین‌ها از طریق تخریب غشای سلولی باکتری‌ها یا تداخل در عملکرد آنزیمی آنها اثر ضدباکتریایی دارند. این ترکیب‌ها معمولاً باعث افزایش نفوذپذیری غشای باکتری و از بین بردن آن می‌شوند. آلکالوئیدها (مانند کوینولین) نیز به دلیل خواص ضد میکروبی طبیعی خود، قادر به مهار رشد باکتری‌ها هستند. مطالعات قبلی بر روی جنس *Viola* نیز نشان دهنده نقش کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها و تانن‌ها در فعالیت‌های ضدباکتریایی بوده‌اند (Witkowska- Banaszczyk et al., 2005; Karioti et al., 2011).

نتایج این مطالعه نشان داد که گل‌ها و برگ‌های گونه *H. longiflorus* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجهی هستند. این فعالیت‌ها به محتوای بالای ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی آنها و حضور ترکیب‌های شیمیایی خاص مانند مونوترپن‌ها، سزکویی‌ترین‌ها، استرها و

References

- Abolghasemi, S., Naderi, R. and Fattahi Moghadam, M., 2020. Evaluation of genetic diversity in Iranian violet (*Viola* spp) populations using morphological and RAPD molecular markers. *Journal of Genetic Resources*, 6(2): 157-171. <https://doi.org/10.22080/jgr.2020.18739.1190>
- Ahmadi, F., Sadeghi, S., Modarresi, M., Abiri, R. and Mikaeli, A., 2010. Chemical composition,

- in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): 1137-1144. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.028>
- Aiyegoro, O.A. and Okoh, A.I., 2010. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC*

- Complementary and Alternative Medicine, 10: 21. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-21>
- Al-Anee, R.S., Sulaiman, G.M., Al-Sammarrae, K.W., Napolitano, G., Bagnati, R., Lania, L., Passoni, A. and Majello, B., 2015. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of the methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* grown in Iraq. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(9-10): 227-235. <https://doi.org/10.1515/znc-2015-4145>
 - Asaadi, A.M. and Khoshnod Yazdi, A., 2018. Ecological properties of medicinal plant of *Hymenocrater calycinus* (Boiss.) Benth. in north-eastern Khorasan, Iran. *Journal of Medicinal plants and By-Products*, 7(2): 189-198. <https://doi.org/10.22092/jmpb.2018.118147>
 - Asri, Y., Sadeh-Hoseinabad Ghaini, F., Vaziri, A. and Akbarzadeh, M., 2017. Essential oil composition from *Hymenocrater calycinus* (Boiss.) Benth. in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3): 712-719. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2017.1329030>
 - Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6): 609-615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
 - Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
 - Doğan, M., Mohammed, F.S., Uysal, İ., Mencik, K., Kına, E., Pehlivan, M. and Sevindik, M., 2023. Total antioxidant status, antimicrobial and antiproliferative potentials of *Viola odorata* (Fragrant Violet). *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(3): 784-791. <https://dx.doi.org/10.33483/jfpau.1161440>
 - Ghavam, M., Bacchetta, G., Castangia, I. and Manca, M.L., 2022. Evaluation of the composition and antimicrobial activities of essential oils from four species of Lamiaceae Martinov native to Iran. *Scientific Reports*, 12(1): 17044. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21509-5>
 - Jamzad, Z., 2012. *Flora of Iran:76 (Lamiaceae)*. Publications of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 1066p. (In persian) <https://www.gisoom.com/book/1875124/>
 - Joharchi, M.R. and Amiri, M.S., 2012. Taxonomic evaluation of misidentification of crude herbal drugs marketed in Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2(2): 105-112. <https://doi.org/10.22038/ajp.2012.41>
 - Karioti, A., Furlan, C., Vincieri, F.F. and Bilia, A.R., 2011. Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399: 1715-1723. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4473-2>
 - Kaundal, R., Kumar, M., Kumar, S., Singh, D. and Kumar, D., 2022. Polyphenolic profiling, antioxidant, and antimicrobial activities revealed the quality and adaptive behavior of *Viola* species, a dietary spice in the Himalayas. *Molecules*, 27(12): 3867. <https://doi.org/10.3390/molecules27123867>
 - Moradi, H., Haddadinejad, M., Yavari, A., Azni, M.M., Musavi, S. and Hosseini, S.M.A., 2021. Comparison of morphological and phytochemical traits in some endogenous genotypes of sweet violet (*Viola odorata* L.) in Mazandaran and Golestan provinces. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 16(63): 101-115. <https://doi.org/10.30495/ipr.2021.686563>
 - Morteza-Semnani, K., Ahadi, H. and Hashemi, Z., 2016. The genus *Hymenocrater*: a comprehensive review. *Pharmaceutical Biology*, 54(12): 3156-3163. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1197285>
 - Mozaffarian, V.A., 1996. *A Dictionary of Iranian Plant Names*. Moaser Publisher, Tehran Farhang, 740p. <https://www.gisoom.com/book/1623365/>
 - Palma, J.M., Rodríguez-Ruiz, M., Foyer, C.H. and Corpas, F.J., 2023. Subcellular compartmentalization of plant antioxidants and ROS generating systems, volume II. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1224289. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1224289>
 - Payez, A.P., Deldadeh, N. and Ghiasvand, S.G., 2022. Evaluation and comparison of antimicrobial and anticancer effects of aqueous and ethanolic extracts of *Viola odorata*. *Multidisciplinary Cancer Investigation*, 6(3): 1-6. <https://dx.doi.org/10.30699/mci.6.3.607-1>

- Sabet Teimouri, M., Kocheki, A. and Nasueu Mahallati, M., 2016. Studding Arvane-Bezghi (*Hymenocrater platystegius* Rech. F.) different ecotypes at natural habitat in Khorasan Razavi province: principal component analysis. Journal of Agroecology, 8(1): 17-32.
<https://doi.org/10.22067/jag.v8i1.51322>
- Vishal, A., Parveen, K., Pooja, S., Kannappan, N. and Kumar, S., 2009. Diuretic, laxative and toxicity studies of *Viola odorata* aerial parts. Pharmacologyonline, 1: 739-748.
<https://pharmacologyonline.silae.it/files/archive/s/2009/vol1/075.Vishal.pdf>
- Witkowska-Banaszczak, E., Bylka, W., Matławska, I., Goślińska, O. and Muszyński, Z., 2005. Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. Fitoterapia, 76(5): 458-461.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.005>
- Yen, G.C. and Chen, H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1): 27-32.
<https://doi.org/10.1021/jf00049a007>
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M.H. and Bahadar, Kh., 2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. Microbial Pathogenesis, 124: 198-202.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>