الكشف عن النشاط المضاد للبكتريا للمستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الرشاد.

حسن موجر رسن ، ، جميل مرعيد بادي ، مصطفى مثنى عبد الرزاق و رحيم حسن رسن
مديرية البحوث والتطبيقات النووية / وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.
arkan.salhi@yahoo.com

الخلاصة

دُرست حساسية بكتريا *Escherichia coli* ، *Proteus vulgaris* ، *Klebsiella pneumonae* ، *Shigella sp* ، *Salmonella typhi* للمستخلص المائي والايثانولي والميثانولي لبذور نبات الرشاد بتراكيز مختلفة (8،12، 17 ملغم/0.1 مل). صممت التجارب بثلاث مكررات واظهرت النتائج ان للمستخلصات المختلفة تاثيراً واسع المدى على البكتريا قيد الدراسة حيث كانت جميع البكتريا المستخدمة حساسة لهذه المستخلصات ولجميع التراكيز وخاصة بكتريا *Escherichia coli* وبكتريا *Salmonella typhi* ، ووجد إن حساسية البكتريا تزداد بزيادة التركيز، و بينت النتائج إن أفضل المستخلصات التي أعطت فعالية تثبيطية عالية هي المستخلص المائي ، كما كان التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل للمستخلصات جميعها اكثر تاثيرًا على أنواع البكتريا عن بقية التراكيز. وشملت هذه الدراسة الكشف عن العديد من المكونات الكيميائية الفعالة (الكلايكوسيدات ، الفلافونويدات ، القلويات،التانينات ، البروتينات، الستيرويدات والفينولات) في بذور النبات باستعمال طرائق الكشف اللونية المعتمدة للمجاميع الفعالة.

الكلمات المفتاحية:مضادات البكتريا، ، بذور الرشاد ، الأعشاب الطبية ، النباتات الطبية.

Detection of antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts of Lepidum sativum seeds.

Hassan M. Resen, , Jameel M.Badi, Mustafa M.Abd Al razak. and Raheem H. Resen .
Nuclear researches and applications Directorate, Ministry of Higher Education &Scientific Research Baghdad- Iraq .

resen66m@yahoo.com,jameelbadi@yahoo.com,Ahmedbio553@yahoo.com,

Abstract
The study was carried out to detect the sensitivity of various bacteria (Escherichia coli،Proteus vulgaris ،Klebsiella pneumonae ،Shigella sp ، Salmonella typhi) against different concentrations (8,12,17 mg/0.1 ml) of Lepidum sativum seeds extracts (aqueous ,ethanolic and methanolic). The results obtained were cleared that all the extracts have shown a wide range of antibacterial effects against applied bacteria. This sensitivity include all the concentrations used specially against Escherichia coli and Salmonella typhi and this sensitivity increased with the increasing of the extract concentration. Finally, best results which were given a high inhibition effect for the aqueous extract among other extracts when 17 mg/ 0.1 ml used.

The obtained results included the detection of many functional groups (Glycosides, Flavonoids, Alkaloids, Tannins, Proteins, Steroids and Phenols) which had been done by different chemical reagents proceeded according to methods mention in the published articles.

Key words: Antimicrobial activity،Lepidum sativum،Herbal medicine, Medicinal plants.

المقدمة

إن النباتات الطبية تعتبر مصادر مهمة للمكونات الفعالة ذات التأثيرات العلاجية ، وذكرت منظمة الصحة العالمية إن 75% من سكان العالم مازال يعتمد على الأدوية المشتقة من النباتات [1] ، ويحتل العلاج بالنباتات الطبية في هذه الأيام حيزا كبيرا في حياتنا اليومية إذ تتباين استعمالات هذه النباتات في علاج مختلف الأمراض الجلدية والباطنية لاحتوائها على كثير من المواد الفعالة ذات الفعل الفسلجي الدوائي [2]، كما انها تمتلك قدرة تثبيطية عالية لأنواع بكتيرية لانها تسلك سلوك المضادات الحيوية في قدرتها على إحداث خلل أو توقف في بعض المسارات الايضية في الخلية البكتيرية [3] ، ومن بين هذه النباتات الطبية المدروسة هو نبات الرشاد (*Lepidum sativum*) ويعرف أيضا الرشاد الجنائني (garden cress) وهو احد افراد العائلة الصليبية وهو نبات عشبي سنوي يصل ارتفاعه إلى 30–50 سم [4] ويكون كثير الأوراق التي تكون كلها مفصصة والأزهار بيضاء وتوجد بشكل عناقيد والثمار بيضوية وتحتوي كل ثمرة على بذرتين فقط [5] ، ويحتوي على مركبات فعالة عديدة تستخدم في العلاج الطبي حيث يحتوي على , glucotropaeoline glucosinolate [6] ويحتوي على فلافونويدات وكبريت وستيرولات وتربينات وكلايكوسيدات والتانينات وأشباه الاميدازول القلوية وكلايكوتربيولينات وقلويدات وليكنانات ومضادات الأكسدة [7] . وذكر الباحثون إن مستخلص بذور الرشاد يستخدم للسيطرة على مشاكل طبية مختلفة حيث يستعمل كمضاد للربو ومضاد للإسقربوط ومدرر وملين ويستخدم كمنبه ومدرر للحليب وان مستخلص بذور الرشاد استعمل بشكل كبير لمعالجة ارتفاع ضغط الدم وامراض الكلي[8،9،10] وكذلك وجد ان زيت بذور الرشاد يستخدم لعلاج الدزنتري وداء الشقيقة [5] وتتصف مستخلصاته بفعالية عالية تجاه الإحياء المجهرية [11]. وتهدف هذه الدراسة إلى معرفة الفعالية التثبيطية لمستخلص بذور الرشاد على أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية والتي قد تساهم في ايجاد بدائل للمواد المثبطة للإحياء المجهرية كالمضادات الحياتية.

المواد وطرائق العمل

أ- المواد:

1–البكتريا المستخدمة :استخدمت الأنواع التالية: *Escherichia coli* ، *Proteus vulgaris* ، *Klebsiella pneumonae* ، *Shigell spp* ، *Salmonella typhi* والتي تم الحصول عليها من دائرة البيئة والمياه / وزارة العلوم والتكنولوجيا حيث تم تشخيصها حسب الطرق المتبعة عالميا واجراء كافة ألاختبارات الكيموحيوية عليها .

2– العينات النباتية: تم الحصول على بذور نبات الرشاد الجافة من الأسواق المحلية وتم سحقها وطحنها بواسطة طاحونة كهربائية وحفظت بعدها في حاويات زجاجية لحين استعمالها في الاستخلاص.

ب- طرائق العمل:

1– تحضير المستخلصات النباتية:

حضر المستخلص المائي والأيثانولي والميثانولي لبذور نبات الرشاد حسب طريقة Anessiny G. وجماعته [12] وكالآتي: أخذ 10 غم من مسحوق البذور وتم وضعها في دورق مخروطي سعة 250 مل ، وأُضيف له 50 مل ماء مقطر وترك منقوعا لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة المختبر، بعد ذلك رسب المزيج باستخدام جهاز الطرد المركزي (من شركة Hettich-Japan) 300 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة ورشح باستخدام ورق الترشيح Whatman رقم 1 (من شركة watman international LTD- England)، وضع المحلول بجهاز المبخر الدوار (من شركة Heidolph-Germany) بدرجة حرارة 40 درجة

مئوية لحين الحصول على سائل كثيف تم تجفيفه في الحاضنة (من شركة - Binder Co) Germany بدرجة حرارة 37 درجة مئوية خلال3- 4 أيام للحصول على المستخلص الجاف. وأتبعت الطريقة نفسها للحصول على المستخلص الايثانولي والميثانولي.

2- الكشف الكيميائي: أخذت عينات من الخلاصات الخام للكشف عن بعض المكونات الفعالة الأساسية (الكلايكوسيدات ، الفلافونويدات ، القلويات ، التانينات ، البروتينات، الستيرويدات والفينولات) التي يحتمل وجودها في بذور النبات، واستخدمت وسائل الكشف اللونية المعتمدة للكشف عن المركبات الفعالة [13].

3 - تحضير التراكيز للمستخلص المائي والايثانولي والميثانولي: حضرت التراكيز النهائية للمستخلص المائي والايثانولي والميثانولي لبذور نبات الرشاد باستخدام الماء المقطر المعقم كمذيب وكانت بتركيز 8 ، 12، 17ملغم/ 0.1 مل.

4- طريقة الكشف عن تأثير المستخلصات النباتية على نمو البكتريا: أتبعت طريقة الانتشار في الحفر لبيان تأثير المستخلصات النباتية على نمو البكتريا المعزولة قيد الدراسة . تم تنشيط العزلات المختبرة المذكورة آنفا وذلك قبل إجراء الكشف عن الفعالية البايولوجية للمستخلصات النباتية عليها وباستعمال أوساط زرعية مختلفة فقد تم تنشيط البكتريا قبل إجراء الفحص بفترة 18- 24 ساعة وبدرجة حرارة ° 35 م وباستعمال الوسط الغذائي Nutrient Broth (من شركة LAB Limited-UK). وتم تحضير اللقاح البكتيري حسب الطريقة التي ذكره [14] وذلك بتنمية البكتريا المنشطة على وسط Nutrient Agar وحضنها بدرجة° 37 م ولمدة 24 ساعة ثم يتم نقل عشر مستعمرات من كل نوع من البكتريا المستخدمة في التجربة وتحت ظروف التعقيم إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 5 مل من الوسط الغذائي Nutrient Broth ثم تحضن بدرجة° 37 م لمدة 4 -6 ساعة وبعدها تم اجراء التخفيفات المناسبة لكل نوع من البكتريا بحيث يكون عدد الخلايا الكلي تقريباً بحدود 10^7في المليلتر [14].

نفذت الاختبارات بطريقة أقداح الاكار(Agar cups) [14]، إذ نُميت بكتريا الاختبار في وسط Nutrient broth وتركت مدة 18-24 ساعة زرعت سطوح الاكار (Nutrient agar) بواسطة مسحة قطنية (cotton swab) معقمة وبعد ان جرى التخلص من الكميات الزائدة من العالق البكتيري بضغط المسحة القطنية بقوة بجدران انبوب الاختبار من الداخل، وبعدها جرى تخطيط الاكار من جميع الجهات لكي تتوزع الكمية بالتساوي واستعمل طبقان لكل عزلة بكتيرية وتركت مدة 30 دقيقة لكي تجف،عملت حفر(Well) باستعمال ثاقب الفلين المعقم وبواقع 4 حفر في الطبق الواحد،عند إجراء الاختبار تم نقل 100 مايكروليتر من المستخلصات إلى الحفر ولغرض التأكيد نقل 100مايكروليتر من الماء المقطر والمعقم إلى حفرة أختيرت عشوائيا كمجموعة سيطرة في كل تجربة وبعد ساعتين حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 درجة مئوية مدة 24 ساعة، وتم قياس قطر منطقة التثبيط باستخدام مسطرة شفافة مدرجة وقد أجريت جميع الاختبارات بثلاث مكررات .

النتائج والمناقشة :

بينت نتائج الكشف الكيميائي الموضحة في جدول رقم1 احتواء المسحوق الجاف والمستخلص المائي والايثانولي والميثانولي على الكلايكوسيدات ، الفلافونات ، القلويدات ، التانينات ، البروتينات ، الستيرويدات والفينولات ، اما الكومارينات والصابونيات فلم يثبت وجودها وكان الرقم الهيدروجيني 5.8 للمستخلص المائي و6.5 للمستخلص الأيثانولي و6.00 للمستخلص الميثانولي.

جدول (1) الكشف عن المجاميع الفعالة في خلاصات بذور نبات الرشاد

المركبات	الكاشف	النتيجة	الدليل
Glycosides	كاشف بندكت	+	راسب احمر قرميدي
Flavonoids	Shinoga test	+	لون وردي
Coumarins	التعريض للأشعة فوق البنفسجية	_	عدم ظهور اللون الأصفر
Saponins	الرج	–	عدم تكون الرغوة
Alkaloids	Mayer test	+	راسب ابيض
Tannins	كلوريد الحديديك 5%	+	لون ازرق غامق
Protins	كاشف بايوريت	+	لون بنفسجي
Steroids	Salkowshi reaction	+	لون ازرق
Phenols	خلات الرصاص	+	راسب ابيض هلامي

+ : وجود المركب – : عدم وجود المركب

بينت النتائج ان المستخلص المائي والايثانولي والميثانولي قد أعطت نتائج ايجابية في تثبيط بكتريا *Escherichia coli* ، *Proteus vulgaris*، *Klebsiella pneumonae* sp، ففي الجدول رقم 2 الذي يبين تأثير المستخلص المائي حيث كان اكثر المستخلصات تأثيرا على أنواع البكتريا قيد الدراسة اعطى معدل اقطار تثبيط اعلى من المستخلص الايثانولي والميثانولي وكانت بكتريا *Escherichia coli* و بكتريا *Salmonella typhi*اكثر البكتريا حساسية حيث أعطت بكتريا *Escherichia coli* معدل اقطار تثبيط 28 ملم عند التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل و *Salmonella typhi*، *Shigella* حيث تباينت معدلات أقطار التثبيط باختلاف المذيب والتركيز ونوع البكتريا حيث ازداد معدل قطر التثبيط بزيادة التركيز في جميع المستخلصات المدروسة .

12ملم عند التركيز 8 ملغم/0.1 مل اما بكتريا *Salmonella typhi*فقد اعطت معدل اقطار تثبيط 28 ملم عند التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل و 14 ملم عند التركيز 8 ملغم/0.1 مل ، وكانت بكتريا *Proteus vulgaris* اكثر البكتريا مقاومة حيث أعطت معدل أقطار تثبيط 14 ملم عند التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل و8 ملم عند التركيز 8 ملغم/0.1 مل.

جدول (2) التاثير التثبيطي للمستخلص المائي لبذور نبات الرشاد تجاه نمو بكتريا الدراسة.

البكتريا	تركيزالمستخلص(ملغم/0.1 مل)	معدلات أقطار التثبيط (ملم)
Escherichia coli	8	12
	12	18
	17	28
Klebsiella pneumonae	8	12
	12	16
	17	24
Proteus vulgaris	8	8
	12	10
	17	14
Shigella sp	8	18
	12	18
	17	22
Salmonella typhi	8	14
	12	18
	17	28

n=3

اما المستخلص الايثانولي لبذور نبات الرشاد والموضحة نتائجه في الجدول رقم 3 لوحظ ان التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل أعطى اعلى معدل أقطار تثبيط والتركيز 8 ملغم/0.1 مل أعطى اقل معدل أقطار تثبيط ،وكانت بكتريا *Salmonella typhi* أكثر البكتريا حساسية حيث أعطت قطر تثبيط 24 ملم عند التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل و16ملم عند التركيز 8 ملغم/0.1 مل وكانت بكتريا *Proteus vulgaris* أكثر البكتريا مقاومة حيث أعطت قطر تثبيط 7 ملم عند التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل و6 ملم عند التركيز 8 ملغم/0.1 مل.

جدول (3) التاثير التثبيطي للمستخلص الأيثانولي لبذور نبات الرشاد تجاه نمو بكتريا الدراسة.

نوع البكتريا	تركيز المستخلص (ملغم/0.1 مل)	معدلات أقطار التثبيط (ملم)
Escherichia coli	8	13
	12	16
	17	20
Klebsiella pneumonae	8	12
	12	16
	17	18
Proteus vulgaris	8	6
	12	7
	17	7
Shigella sp	8	6
	12	9
	17	10
Salmonella typhi	8	16
	12	18
	17	24

n=3

اما المستخلص الميثانولي والموضحة نتائجه في الجدول رقم 4 فكان اقل المستخلصات تأثيرا على البكتريا قيد الدراسة حيث أعطى معدل أقطار تثبيط 10 ملم عند التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل و 8 ملم عند التركيز 8 ملغم/0.1 مل لكل من بكتريا *Escherichia coli* و بكتريا *Salmonella typhi* وبكتريا *Proteus vulgaris* اما بكتريا *Klebsiella pneumonae* وبكتريا *Shigella spp* فكان معدل أقطار التثبيط 7 ملم و8 ملم عند التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل على التوالي و7 ملم عند التركيز 8 ملغم/0.1 مل

جدول(4)التاثير التثبيطي للمستخلص الميثانولي لبذور نبات الرشاد تجاه نمو بكتريا الدراسة.

البكتريا	تركيز المستخلص (ملغم/0.1 مل)	معدلات أقطار التثبيط (ملم)
Escherichia coli	8	8
	12	9
	17	10
Klebsiella pneumonae	8	7
	12	7
	17	7
Proteus vulgaris	8	8
	12	9
	17	10
Shigella sp	8	7
	12	7
	17	8
Salmonella typhi	8	8
	12	9
	17	10

n=3

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها الدور الفعال للمستخلص المائي والأيثانولي والميثانولي في تثبيط نمو البكتريا قيد الدراسة وهذا يعود إلى المركبات الفعالة في بذور نبات الرشاد مثل الفلافونويدات، القلويدات ،الستيرويدات ، التانينات والكلايكوسيدات والتي اشارت اليها المصادر العلمية العالمية [15]، وهذه المركبات معروفة بفعاليتها البايولوجية [4]، حيث وجد ان التانينات تشكل معقدات مع بروتينات الخلية الغنية بالبرولين تؤدي الى منع تخليق بروتين الخلية البكتيرية [16]، كما تقوم التانينات بتحطيم البروتينات والتراكيب الأخرى المتواجدة على جدار الخلية البكترية [17]. واكد بعض الباحثين [18] ان الفينولات والفلافونات لها دور مهم في تثبيط نمو البكتريا التي تعمل على تثبيط الأنزيمات المسؤولة عن التفاعلات الأيضية الأساسية بتداخلها غير المتخصص مع البروتينات مما يؤدي الى مسخ البروتين (Protein denaturation) أي تغيير الصفات الطبيعية ومن ثم عدم قدرة البكتريا على الأستمرار. كما ان للفينولات خصائص مضادة للبكتريا من خلال إعاقة قوة حركة البروتون proton move force (PMF -) مسببة بذلك تسرب المكونات الخلوية وتثبيط الأنزيمات ونقل الألكترون وعملية

Oxidative phosphorylation وتجلط المكونات السايتوبلازمية [19]. ويمكن تفسير نتائج الدراسة الحالية إلى أن المستخلص النباتي قد عمل بشكل مماثل لميكانيكية عمل المضادات الحياتية المصنعة، وربما يكون قد قام بتثبيط بناء البروتينات الأساسية والأحماض النووية (RNA و DNA) أو تحطيم الغشاء البلازمي وما يحويه من دهون وبروتينات وبالتالي تثبيط عمل القنوات والنواقل الأيونية [20]، مما أدى إلى تراكم القلويدات داخل الخلية البكتيرية وذلك لكونها كارهة للماء[21].

بينت نتائج الدراسة كفاءة مستخلص بذور نبات الرشاد في قتل أو تثبيط النمو البكتيري وان أفضل المستخلصات التي أعطت فعالية تثبيطية عالية هي المستخلص المائي وقد يعود السبب في ذلك إلى قابلية المواد الفعالة على الذوبان في الماء بنسبة أعلى مما عليه في الكحول والميثانول مما يزيد من فعالية المستخلص المائي ، كما كان التركيز 17 ملغم/ 0.1 مل للمستخلصات جمعيها اكثر تاثيرًا على أنواع البكتريا المدروسة من بقية التراكيز.

تأتي نتائج الدراسة الحالية استجابة للتوصيات والمقالات العلمية المختلفة وخصوصا تلك الصادرة من منظمة الصحة العالمية (World Health Organization - WHO) والتي تدعو إلى تكثيف الجهد البحثي من أجل زيادة مجالات استخدام وتطبيق النباتات الطبية كمصادر للطب البديل وذلك لمحتواها العالي من المركبات الفعالة حياتيا (Bioactive) التي اكدت التجارب العلمية أهميتها الصيدلانية.

المصادر:

1. Barry, A. L. (1980). Procedure for testing antimicrobial agents in agar media.In: Antibiotics in Laboratory Medicine.V.Lorin(ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, USA: 1- 23.
2. Brotonegoro, S. and W. Wiharti, (2001). *Lepidium sativum*.L, In: Van Valkenburg J.L.C.H. and N. Bunyapraphatsara.(Eds.), Plant Resources of South-East Asia No 12 (2): Medicinal and Poisonous Plants.
3. Clark, A. M. (1996). Natural products as a resource for new drugs. Pharm. Res., 13: 1996- 2006.
4. Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents, J.Clinical Biology American Society for microbiology. Miam University. Oxford.Ohio.,12(4). 564-582.
5. Diwakara,B.T.; Duttaa,P.K.; Lokeshb B.R.and Naidu,K.A.(2008). Bioavailability and metabolism of fatty acid rich garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil in albino rats ,Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 78: 123-130.
6. Hagerman, A.E. and Butler, I.G. (1981). The specificity of prontho-cyanidin-protein implication, J. Biol. Chem., 256: 4494-4497.
7. Imran, M.; Khan, H.; Shah, M. and Khan, F. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* Species. J. Zhejiang Univ. Sci., B., 11: 973-980.
8. Jouad,H.;aloui,M.;Rhiouani,H.;ElHilaly,J.andEddouks,M.(2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco. J. Ethnopharmacol.,77: 175 – 182.
9. Maghrani,M.N.; Zeggwah,J.M. and ouks,(2005). Antihypertensive effect of *Lepidium sativum* inspontaeneously hypertensive reats.J. Ethnopham ., 100 : 193-197.

10. Maghrani, M.; Zeggwagh,N.; Haloui, M.and Eddouks, M. (2005). Acute diuretic effect of aqueous extract of Retama raetam in normal rats. J. Ethnopharmacol., 99: 31–35.
11.Mason, T.L. and Wasserman, B.P. (1987) .Inactive of red beta glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. Phytochemistry, 26:2197-2202. Pac.J. Clin. Nutr., 13(3):295-307.
12. Merzouki, A.; Ed-derfoufi, F. and Moleromesa, J. (2000). Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. Flok Medicine in ksra lakbir district (INW Moroco). Fitoterapia, 71: 278-307.
13. Oboh, A.P.; Abula,E.O.(1997) .The antimicrobial activities of extracts of *Sidiumguagava* & *itrusaurantifolia*.Niger.J.Biotechnol .,8(1):25-29.
14. Radwan, H.M.; El-Missiry, M.M.; Al-Said,W.M.;Ismail, A.S.; Abdel Shafeek, Seif and El-Nasr, M.M. (2007) .Investigation of the glucosinolates of Lepidium sativum growing in Egypt and their biological activity. Res. J. Medicine Med. Sci.,2: 127-132.
15. Randhir,R.; LinY. T. and Shetty,K. (2004).Phenolics their antint and antibacterial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. Medicinal and Poisonous Plants, 12 (2).
16. Shama, I.Y. Adam, Shayma, A.M. Salih and Warda, S. Abdelgadir.(2011) Invitro Antimicrobial Assessment of *Lepidium sativum* L. Seeds Extracts. Asian Journal of Medical Sciences, 3(6): 261-266.
17.Songsak,T.and Lockwood,G.B.(2002). Glucosinolate of seven plants from Thailand. J.Fitoterpia ,73:209-216.
18-Tegos,G.; Stermilz, F.R.; Lomovskaya, O. and Lewis, K.(2002).Multidrug pump inhibitors uncover activity of plant antimicrobials. Antimicrob. Agents,46 (10): 3133-3141.
19.Umang ,Patel;Mukul, Kulkarni; Vaishali Undale and Ashok. (2009).Methanol Extracts of *Lepidium sativum* Garden Cress (Cruciferae) in Rats.Tropical Journal of Pharmaceutical Research,8 (3): 215-219.
20. Wink, M. (1997). Special nitrogen metabolism. In: Dey, P. M. and Harborne , J. B. (Eds). Plant biochemistry Academic Press LLCC, Florida,436-486.
21.Yogesh,CH.Y.; Avijeet;J.; Srivastav, D.N. and Anurekha, J. (2011). Fracture Healing Activity of ethanolic extract of Lepidium sativum seeds in internally fixed rats femoral osteotomy model. International J.of Pharmacy and Pharmaceutical sciences, 3(2): 193-197.