JRIFST
مقالهٔ کامل پژوهشی

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۹، جلد ۹، شماره ۱، صفحات ۲۷-۴۰
DOI: 10.22101/JRIFST.2019.09.17.e1031

خواص فیزیکوشیمیایی، ضدمیکروبی و محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بره‌موم کندوهای زنبورعسل استان خراسان رضوی

بی‌بی مرضیه رضوی‌زاده[1*]، راضیه نیازمند[2]، سمیه حاجی‌نژاد[3]، احسان اکبری[3]

۱- دانشیار، گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسندهٔ مسئول (m.razavizadeh@rifst.ac.ir)
۲- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۰

واژه‌های کلیدی
بره‌موم
ترکیبات فنلی
ترکیبات فلاونوئیدی
فعالیت ضدمیکروبی
کروماتوگرافی

چکیده

در این تحقیق ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضدمیکروبی بره‌موم حاصل از کندوهای زنبورعسل شمال شهر مشهد و نیز محتوی ترکیبات مؤثرهٔ موجود در بره‌موم به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به‌طور کمّی و کیفی تعیین گردیده است. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونهٔ بره‌موم (مانند خاکستر، رطوبت، مواد جامد محلول و نامحلول و عناصر فلزی موجود) اندازه‌گیری شدند. مقدار ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدی در عصارهٔ اتانولی بره‌موم به‌ترتیب ۴۰/۲۱۶ میلی‌گرم بر گرم (برحسب اسید گالیک) و ۲۶/۴۰ میلی‌گرم بر گرم (برحسب کوئرستین) به‌دست آمد. آزمون‌های ضدمیکروبی نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود درحالی‌که در غلظت به‌کاررفته برای باکتری *اشرشیاکلی* MIC به‌دست نیامد. همچنین، نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی (MBC) حاکی از آن بود که عصارهٔ بره‌موم روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها اثر مهارکنندگی دارد. ارزیابی محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصارهٔ بره‌موم به کمک HPLC نشان داد ترکیبات فلاونوئیدی شناسایی‌شده شامل فلاون‌ها (۱۳/۳۵۰ میلی‌گرم بر گرم)، فلاونوئیدها (۶/۳۷۵ میلی‌گرم بر گرم)، فلاونل‌ها (۸/۲۳۵ میلی‌گرم بر گرم) و فلاونون‌ها (۱۶/۸۲۵ میلی‌گرم بر گرم) بودند. براساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان از بره‌موم در صنایع مختلف غذایی و دارویی استفاده کرد.

مقدمه

بره‌موم از تولیدات زنبورعسل است، حالت آن خمیری‌شکل و چسبناک می‌باشد، بویی مطبوع دارد و رنگ آن از سبز تا قهوه‌ای تیره متغیر است. بره‌موم به‌عنوان مادهٔ ضدعفونی‌کننده و عاملی مؤثر در پیشگیری از ورود و شیوع بیماری‌ها در کندو بشمار می‌آید (Kumazawa, Hamasaka, & Nakayama, 2004؛ اشراقی و والافر، ۱۳۸۲؛ اونق، توکمهچی، حسامی، و ابراهیم‌زاده، ۱۳۸۹؛ مؤمن‌بیت‌الهی و همکاران، ۱۳۸۸). این ماده حاوی صمغ یا رزین گیاهان، موم، اسیدهای چرب ضروری، گردهٔ گل، ترکیبات آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی است. مقدار و نوع ترکیبات بره‌موم بسته به مکان و زمان جمع‌آوری و روش تولید آن متفاوت است (Kumazawa *et al*., 2004).

بره‌موم در الکل اتیلیک، استن و بنزن حل می‌شود و

الکل می‌تواند مواد قابل حل آن را جدا نماید. بخش بزرگی از بره‌موم که به‌راحتی در آب یا حلال‌های آلی محلول نیست، احتمالاً شامل مواد طبیعی پلیمری است. ترکیب شیمیایی بره‌موم بسیار متغیر است و به شدت به منابع گیاهی موجود دردسترس زنبورها در مکان‌های مختلف بستگی دارد و این مسئله تحت‌تأثیر منشأ جغرافیایی و شرایط آب‌وهوایی آن منطقه بستگی دارد. به‌عنوان مثال، در بره‌موم مناطق معتدل، بیشترین ترکیبات فعال بیولوژیکی پلی‌فنل‌ها، ازجمله اسیدهای فنلیک و فلاونوئیدها هستند (Socha *et al.*, 2011; Tosic, Stojanović, Mitic, Pavlović, & Alagić, 2017; Uzel *et al.*, 2005). مهم‌ترین اجزای فعال فارماکولوژیکی موجود در بره‌موم عبارتند از فلاون‌ها[1]، فلاونول‌ها[2]، فلاونون‌ها[3] (که جمعاً فلاونوئیدها نامیده می‌شوند) و سایر ترکیبات فنلیک و آروماتیک هستند. برای استخراج این ترکیبات مؤثره باید با استفاده از حلال مناسب، مواد زائد و بی‌فایده حذف گردد و پس از خالص‌سازی عصارهٔ آن تهیه شود (Kumazawa *et al.*, 2004; Socha *et al.*, 2011; Tosi, Ré, Ortega, & Cazzoli, 2007).

استفادهٔ تجاری اصلی بره‌موم به‌عنوان یک مکمل غذایی و درمانی می‌باشد. همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانی، فعالیت‌های ضدمیکروبی و ضدقارچ بره‌موم فرصت‌هایی را در تکنولوژی مواد غذایی ایجاد می‌کند (Bankova, Castro, & Marcucci, 2000; Kumazawa et al., 2004; Lima, Lopes, Rossetto, & Vianello, 2009; Uzel *et al.*, 2005؛ اونق و همکاران، ۱۳۸۹؛ نشوه و ناظر، ۱۳۹۳). استفادهٔ روزافزون از بره‌موم نیاز به روش‌های مناسب برای تعیین کمّی اجزای فعال آن دارد و ازاین‌رو، روش‌های کروماتوگرافی امکان جداسازی و اندازه‌گیری تمام اجزای آن را میسر می‌سازد (اونق و همکاران، ۱۳۸۹؛ رضوی‌زاده و نیازمند، ۱۳۹۷؛ Bruschi, Franco, & Gremião, 2003؛ Kartal, Kaya, & Kurucu, 2002).

برخی از تحقیق‌های انجام‌شده روی اجزاء بره‌موم نشان می‌دهد که مجموعه‌ای از ترکیبات جداشده از بره‌موم به‌طور قابل‌توجهی با ترکیبات موجود در گیاهانی که زنبورعسل از آنها تغذیه می‌کند مربوط هستند. ازآنجاکه بزرگ‌ترین گروه از ترکیبات موجود در گیاه رنگدانه‌های فلاونوئیدی هستند، انتظار می‌رود که همان ترکیبات از نمونه‌های مختلف بره‌موم جداسازی شوند، به‌ویژه که اکثر آنها فلاون، فلاونون و فلاونول هستند. تحقیق‌ها نشان‌داده است که میان مقدار کل فلاونوئیدها و فعالیت بیولوژیکی و ضدمیکروبی در بره‌موم همبستگی معنی‌داری وجود دارد (Banskota, Tezuka, & Kadota, 2001; Kujumgiev *et al.*, 1999). علاوه‌بر این، مشخص شده است که فعالیت ضدمیکروبی تنها به یک جزء (یا یک ترکیب فلاونوئیدی) مرتبط نمی‌باشد (Kujumgiev *et al.*, 1999; Serra Bonvehí, Ventura-Coll, & Escolà Jordà, 1994). بلکه، به‌نظر می‌رسد که مقدار ترکیبات فعال به گروه‌هایی که یک ساختار شیمیایی مشابه یا نزدیک دارند بهتر با فعالیت بیولوژیکی همبستگی دارند (Banskota *et al.*, 2001; Kujumgiev *et al.*, 1999; Serra Bonvehí *et al.*, 1994). هدف از این تحقیق، بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضدمیکروبی بره‌موم حاصل از کندوهای زنبورعسل منطقهٔ شمال مشهد (استان خراسان رضوی) و نیز شناسایی ترکیبات مؤثرهٔ آن به روش کروماتوگرافی است.

مواد و روش‌ها

بره‌موم از مناطق اطراف مشهد (منطقهٔ شمال مشهد، کوه‌های هزارمسجد، خراسان رضوی) تهیه گردید. پوشش گیاهی غالب کوه‌های هزارمسجد گَوَن است و علاوه‌برآن شامل گیاهانی ازجمله خارشتر، آنغوزه، بومادران، موسیر و کاکوتی می‌رویند (ضیایی‌لائین، ۱۳۹۱؛ علی، ۱۳۹۵). الکل اتیلیک (اتانول) با درجهٔ تجاری ۹۶ درصد (شرکت تقطیر خراسان، ساخت ایران) خریداری شد. معرف فولین-سی‌کالچیو[4] و اسید گالیک از شرکت سیگما-آلدریچ سفارش داده شدند. استانداردهای معتبر اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها برای کروماتوگرافی از شرکت سیگما-آلدریچ خریداری شدند.

محیط‌های کشت مولر هینتون آگار[5] و کشت مولر هینتون براث[6] (شرکت Himedia، ساخت فرانسه) خریداری گردید. بانک باکتری‌ها شامل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*[7] (PTCC 1764) و *اشرشیاکلی*[8] (PTCC 1330)، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی) تهیه شد.

[1] Flavons
[2] Flavonols
[3] Flavonones
[4] Folin-Ciocaltue
[5] Muller Hinton Agar (MHA)
[6] Muller Hinton Broth (MHB)
[7] *Staphylococcus Aureus*
[8] *Escherichia Coli*

آماده‌سازی بره‌موم

بره‌موم خام با استفاده از آسیاب برقی (مدل T8300، توس شکن خراسان، ساخت ایران) پودر شد و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. پودر به‌دست‌آمده برای استفاده‌های بعدی در ظرف در بسته و در یخچال (دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری شد.

تهیهٔ عصارهٔ اتانولی بره‌موم

مقدار ۳۰ گرم از بره‌موم خام پودرشده به یک ارلن با ظرفیت ۵۰۰ میلی‌لیتر منتقل شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. دهانه و اطراف ارلن کاملاً با فویل آلومینیومی پوشیده شد و ارلن همراه با محتویاتش روی هم‌زن مغناطیسی برای مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. بعد از مدت زمان اعمال‌شده، مخلوط تهیه‌شده توسط کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱ و به کمک پمپ خلأ دو بار صاف گردید. محلول صاف‌شده در ظروف پتری‌دیش ریخته شد و این ظروف در محل تاریک و دور از نور و در دمای محیط قرار داده شد تا حلال حذف گردد. عصارهٔ خشک‌شده برای استفاده‌های بعدی در ظرف شیشه‌ای تیره و در یخچال با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (Popova, Silici, Kaftanoglu, & Bankova, 2005).

تعیین ویژگی‌های بره‌موم

تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

برای تعیین رطوبت بره‌موم، ۵ گرم بره‌موم خام پودرشده در یک گرم‌کن الکتریکی (Memert، مدل UF55، ساخت آلمان) در دمای ۱۰۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۱ ساعت خشک شد (Dias, Pereira, & Estevinho, 2012). بعد از این مدت، آن را تا دمای اتاق خنک و توزین‌کرده و دوباره عملیات گرم‌خانه‌گذاری تا رسیدن به وزن ثابت تکرار شد. محتوی رطوبت براساس رابطهٔ (۱) تعیین گردید:

رابطهٔ (۱)

$$\text{رطوبت}\ (\text{درصد}) = ۱۰۰ \times (A1 - A2)/A1$$

در رابطهٔ (۱)، A1: وزن نمونه و A2: وزن نمونهٔ خشک‌شده می‌باشد.

مقدار مواد جامد محلول و نامحلول در نمونهٔ بره‌موم با حلال اتانول تعیین شد (Dias *et al.*, 2012). به‌این‌ترتیب که به ۱ گرم از پودر بره‌موم خام ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد. مخلوط با یک همزن مغناطیسی (IKA، RH.basic2، ساخت آلمان) هم‌زده شد و پس از ۳۰ دقیقه، محلول صاف‌شده و مواد جامد نامحلول وزن شدند. مواد جامد محلول (SS) با اختلاف وزن بین نمونه (SW) و مواد نامحلول (IW) تعیین شدند و نتیجه به درصد براساس رابطه‌های (۲) و (۳) به‌دست آمد.

رابطهٔ (۲)

$$SS(\%) = 100 \times \frac{SW - IW}{SW}$$

رابطهٔ (۳)

$$IS = 100 \times \frac{IW}{SW}$$

pH بره‌موم به کمک pHمتر (Adwa، AD8000، ساخت رومانی) در محلول تهیه‌شده با ۱۰ گرم بره‌موم خام پودرشده در ۷۵ میلی‌لیتر متانول، با استفاده از متانول به‌عنوان کنترل اندازه‌گیری شد (Dias *et al.*, 2012). کالیبراسیون با سه محلول بافر استاندارد انجام شد.

برای تعیین محتوای خاکستر بره‌موم (شامل مواد معدنی و مواد غیرمعدنی دیگر)، مقدار ۵ گرم بره‌موم خام پودرشده در یک ظرف پلاتینی خشک گردید (Dias *et al.*, 2012). برای انجام این کار، نمونه در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت و حذف کامل رطوبت نگهداری شد، سپس در کورهٔ الکتریکی (Exction، مدل TZ4ST، ساخت ایران) در دمای ۵۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا زمانی که کاملاً به خاکستر سفید تبدیل شد. محتوای خاکستر کل، به‌صورت درصد باقی‌مانده پس از اکسیداسیون خشک از رابطهٔ (۴) محاسبه شد.

رابطهٔ (۴)

$$\text{خاکستر}\ (\%) = [\frac{m1 - m2}{m0}] \times 100$$

در رابطهٔ (۴)، m1: جرم ظرف و خاکستر، m2: جرم ظرف پلاتین قبل از کلسینه‌کردن و m0: جرم بره‌موم اولیه است.

اندازه‌گیری عناصر فلزی در خاکستر نمونه توسط دستگاه جذب اتمی (GBC، Sens AA Dual، ساخت استرالیا) انجام گردید (Tosic *et al.*, 2017).

برای تعیین مقدار موم، به ۲۵ گرم از نمونه بره‌موم خام پودرشده ۷۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. مخلوط در فریزر (۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد) یک شب کامل قرار گرفت. پس از آن، محلول فیلتر شد تا موم به‌دست آید. مقدار موم با استفاده از نمونهٔ وزن (SW) و وزن موم (WW) و مطابق

با رابطهٔ (۵) برحسب درصد وزنی محاسبه گردید (Dias *et al.*, 2012).

رابطهٔ (۵)

$$\text{موم}\ (\text{درصد}) = \frac{WW}{SW} \times 100$$

تعیین ترکیبات فنلی کل

میزان ترکیبات فنلی کل براساس روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالچیو و برحسب اسید گالیک اندازه‌گیری شد. برای‌این‌منظور، ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر گرم) از اسید گالیک در اتانول ۷۰ درصد تهیه و از آنها ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین -سی‌کالچیو مخلوط و طی مدت ۰/۵ تا ۸ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (وزنی/حجمی) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سپس جذب نوری آنها به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفوتومتر (Hach، DR5000، ساخت آمریکا) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و نمودار استاندارد رسم شد (Association of Official Analytical & Helrich, 1990; Lima *et al.*, 2009). سپس، مقدار ۰/۰۵ گرم از عصارهٔ خشک‌شدهٔ بره‌موم در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق‌سازی شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول با ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سی‌کالچیو مخلوط شد و به مدت ۱ تا ۸ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و مقدار ترکیبات فنلی برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصارهٔ خشک محاسبه گردید (Lima *et al.*, 2009).

اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی

سنجش فلاونوئیدها براساس آزمون رنگ‌سنجی صورت گرفت (Popova *et al.*, 2005). بدین‌ترتیب‌که ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصارهٔ اتانولی بره‌موم تهیه‌شدهٔ نهایی در قسمت ترکیبات فنلی کل به ۱ میلی‌لیتر از محلول ۲ درصد کلرید آلومینیوم ($AlCl_3.6H_2O$) اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در محل تاریک جذب آن در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش از کوئرستین (محلول آبی کوئرستین با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر گرم) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج براساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصارهٔ خشک بیان گردید.

تعیین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

۰/۲۵ گرم از عصاره را وزن‌کرده و با اتانول ۷۰ درصد به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به ۲ میلی‌لیتر از محلول آماده‌شده ۲ میلی‌لیتر معرف ۲و۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل[1] (DPPH) اضافه شد و دور لوله با فویل آلومینیومی پوشانده شد و برای ۳۰ دقیقه در جای تاریک قرار داده شد. بعد از این جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. برای نمونهٔ شاهد نیز دقیقاً به‌همین‌صورت عمل گردید با این تفاوت که به‌جای نمونه از اتانول ۷۰ درصد استفاده گردید. محتوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از رابطهٔ (۶) محاسبه گردید (Wang, Sun, Cao, Tian, & Li, 2008).

رابطهٔ (۶)

$$\text{ترکیبات آنتی اکسیدانی}\ (\text{درصد}) = \left[\frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}}\right] \times ۱۰۰$$

تعیین خاصیت ضدمیکروبی بره‌موم

طبق تعریف کمترین غلظتی از بره‌موم که مانع رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش گردد (غلظت آخرین چاهکی که در آن هیچ کدورتی ایجاد نشده باشد) حداقل غلظت مهارکنندگی[2] (MIC) نامیده می‌شود. در این مطالعه از روش براث میکرو دایلوشن[3] برای تعیین MIC استفاده شد. به‌این‌ترتیب که از هریک از سویه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* در محیط مولر هینتون براث کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد تا سوسپانسیونی با غلظت ۱×۱۰^{۶} (واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر[4]) به‌دست آید. همچنین، از عصارهٔ الکلی بره‌موم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رقت‌های متوالی در محیط براث تهیه شد و در میکروپلیت ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره ریخته شد. سپس ۹۵ میکرولیتر از محیط کشت براث و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. همچنین دو چاهک به‌عنوان کنترل منفی درنظرگرفته شدند که یکی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت براث با حلال (اتانول ۷۰

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
[2] Minimum Inhibition Concentration
[3] Broth micro dilution method
[4] Colony Forming Unit

درصد) و باکتری و دیگری شامل ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت و باکتری بودند و نیز یک چاهک حاوی محیط کشت، باکتری و آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین) به‌عنوان کنترل مثبت درنظرگرفته شد. سپس میکروپلیت‌ها پوشیده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌راد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر به کمک الایزاریدر (AWARENESS Technologies INC، Stat fax 2100، ساخت آمریکا) خوانده شد و نتایج ثبت گردید (Aamer, Abdul-Hafeez, & Sayed, 2014; Ristivojević *et al.*, 2016)

بعد از تعیین MIC، آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی[1] (MBC) (حداقل غلظتی از برهموم که ۹۹/۹ درصد از تراکم اولیهٔ باکتری را کاهش دهد) نیز انجام شد. برای‌این‌منظور ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌ها برداشته و در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. این پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از این مدت عدم رشد باکتری نشان‌دهندهٔ MBC است (Aamer *et al.*, 2014; Ristivojević *et al.*, 2016؛ اونق و همکاران، ۱۳۸۹؛ تیموری، ۱۳۸۸).

تعیین محتوی ترکیبات فنلی به روش کروماتوگرافی

جداسازی و شناسایی ترکیبات فنلی عصارهٔ برهموم به کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[2] (HPLC) (Agilent، HPLC 1100، ساخت آمریکا) همراه با آشکارساز آرایه دیودی[3] در ۲۶۰ نانومتر انجام شد. برای‌این‌منظور ۳۰۰ میکرولیتر از محلول به دستگاه کروماتوگرام تزریق شد. فاز متحرک شامل آب/اسید استیک (به نسبت ۱/۱۹ حجمی/حجمی) (حلال A) و متانول (حلال B) با سرعت جریان ثابت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. گرادیان با ۳۰ درصد حلال B شروع شد و با ۶۰ درصد در ۴۵ دقیقه، ۷۵ درصد در ۸۵ دقیقه، ۹۰ درصد در ۹۵ دقیقه و بازگشت به ۳۰ درصد در ۱۰۵ دقیقه ادامه پیدا کرد. دمای ستون در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد ثابت نگه‌داشته شد و پردازش کروماتوگرام‌ها با استفاده از نرم‌افزار رایانهٔ کروماتوگرافی کِم‌استیت[4] (Agilent، NIST chromatography data base، ساخت آمریکا) انجام گردید (Mello, Petrus, & Hubinger, 2010).

[1] Minimum Bactericidal Concentration
[2] High Performance Liquid Chromatography
[3] Diode Array
[4] Chemstate

تحلیل آماری

برای تجزیه‌وتحلیل آماری از طرح کاملاً تصادفی ساده در قالب آزمایش‌های فاکتوریل استفاده شد و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب[5] نسخهٔ ۱۶,۲,۴ انجام شد. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی[6] در سطح اطمینان ۹۵ درصد، ($P<۰/۰۵$) صورت گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخهٔ ۲۰۱۰ رسم شد. لازم به ذکر است که کلیهٔ آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برهموم

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برهموم اطلاعاتی را فراهم می‌سازد که برای تشخیص هر نمونه متناسب با منشأ جغرافیایی آن قابل استفاده است. ازآنجایی‌که هر نمونه برهموم همراه با مقادیر و منابع متفاوتی از ترکیبات شیمیایی است، لذا ویژگی‌های متفاوتی مانند رنگ، عطر و نیز اثر ضدمیکروبی به‌جا می‌گذارد. این ویژگی‌ها به مقدار و مبدأ تولید این محصول بستگی دارد (Dias *et al.*, 2012؛ اونق و همکاران، ۱۳۸۹). ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برهموم مورداستفاده در این مطالعه در جدول (۱) خلاصه شده است.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی به‌دست‌آمده از نمونهٔ برهموم مورداستفاده ازقبیل رطوبت، خاکستر، مواد جامد محلول و نامحلول و pH قابل‌مقایسه با نتایج گزارش‌شده ازسوی‌دیگر محققین است (Saturnino da Silva AraÚJo *et al.*, 2016; Socha *et al.*, 2011). این ویژگی‌ها نشان‌دهندهٔ نوع منشأ گیاهی مورداستفاده و نیز خصوصیات منطقهٔ آب‌وهوایی و جغرافیایی محصول برهموم است. Dias و همکاران (۲۰۱۲) مقدار خاکستر ۴ نوع برهموم جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف پرتغال را به‌دست آوردند که نتایج آنها بین ۱/۹ تا ۲/۲ درصد تعیین گردید. این گروه از محققین مقدار موم موجود در نمونه‌های

[5] Minitab
[6] Tukey

بره‌موم را بین ۴/۶ تا ۱۶ درصد، محتوای رطوبت را بین ۳/۴ تا ۵/۴ درصد، مواد جامد محلول را ۶۰ تا ۷۱ درصد و pH را ۴/۷ تا ۵/۳ به‌دست آوردند. Woisky و Salatino (۱۹۹۸) مقدار خاکستر نمونه‌های بره‌موم برزیل (۴ منطقهٔ مختلف سان‌پائولو) را بین ۱/۸۷ تا ۳/۷۴ درصد وزنی و مقدار موم را بین ۴/۶۳ تا ۷/۸۲ درصد وزنی گزارش کردند.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونهٔ بره‌موم (میانگین±انحراف استاندارد)

ویژگی	مقدار
رطوبت (درصد)	۲/۴۱±۰/۲۵
pH	۵/۲۹±۰/۰۶
خاکستر (درصد)	۳/۲۸±۰/۰۷
مواد جامد محلول (درصد)	۴۶/۸۵±۰/۹۰
مواد جامد نامحلول (درصد)	۵۳/۱۵±۰/۹۱
موم (درصد)	۳۶/۳۶±۰/۹۴
فنل کل (میلی‌گرم بر گرم)	۴۰/۲۲±۰/۸۷
محتوی فلاونوئیدها (میلی‌گرم بر گرم)	۲۶/۴۰±۰/۵۹
محتوی آنتی‌اکسیدان (درصد)	۶۰/۶۹±۰/۹۳

همچنین محتوی عناصر فلزی در خاکستر نمونه‌ها بررسی گردید و مقادیر آنها در جدول (۲) درج شده است. ملاحظه می‌گردد که فلزات کلسیم، منیزیم، آهن، پتاسیم و سدیم بیشترین مقادیر را در میان عناصر تعیین‌شده دارند. این مقادیر در توافق با مقادیر اعلام‌شده ازسوی‌دیگر محققین می‌باشد (Tosic *et al.*, 2017). Lima و همکاران (۲۰۰۹) در در مطالعهٔ خود روی نمونه‌های ۶ منطقهٔ مختلف آرژانتین گزارش کردند که محتوی فلزی کلسیم، پتاسیم، آهن، سدیم، و منیزیم در مقادیر زیاد بود اما مقدار روی و منگنز در آنها پایین بود. گروه دیگری از محققین برای اولین بار از طیف‌سنجی مادون‌قرمز نزدیک[1] کار کیفی روی تعداد ۹۱ نمونه بره‌موم (۵۲ نمونه از شیلی و ۳۹ نمونه از اسپانیا) انجام دادند و گسترهٔ وسیعی از مواد معدنی و نیز مواد سمی موجود را در آن شناسایی کردند (González-Martín *et al.*, 2015). نتایج آنها نشان داد که عناصر آلومینیوم، کلسیم، آهن، پتاسیم و فسفر دارای بیشترین مقدار در این نمونه‌ها می‌باشد درحالی‌که عناصری مانند کروم، مس، روی، نیکل و سرب به مقدار بسیار ناچیز بودند.

جدول ۲- محتوی کاتیون‌های فلزی در نمونهٔ بره‌موم (میانگین±انحراف استاندارد)

کاتیون فلزی	مقدار (میلی‌گرم در کیلوگرم)
کلسیم (Ca)	۱۹۸۳/۲۹±۲۳۳/۰۰
منیزیم (Mg)	۵۷۰/۲۳±۵۸/۶۰
آهن (Fe)	۴۸۳/۰۴±۴۶/۳۰
پتاسیم (K)	۴۲۸/۲۹±۶۸/۷۰
سدیم (Na)	۳۷۱/۷۱±۱۱/۳۴
روی (Zn)	۱۲/۶۰±۰/۵۲
مس (Cu)	۶/۷۳±۰/۰۶
سرب (Pb)	۱/۰۹±۰/۶۸

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی

فنل‌ها و فلاونوئیدها در بسیاری از ترکیبات طبیعی و ازجمله بره‌موم یافت می‌شوند. این ترکیبات نه تنها اثرات آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند بلکه بر میکروارگانیسم‌ها نیز می‌توانند اثر گذاشته و باعث تخریب یا ممانعت از رشد آنها گردند. میزان کل ترکیبات فنلی و نیز محتوی ترکیبات فلاونوئیدی در نمونهٔ بره‌موم مورداستفاده به‌ترتیب ۴۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم (برحسب اسید گالیک) و ۲۶/۴۰ میلی‌گرم بر گرم (برحسب کوئرستین) به‌دست آمد (جدول ۱). مقدار کل فنل و فلاونوئیدها پارامترهای مهمی برای ارزیابی کمی و ظرفیت بیولوژیکی محصول هستند (Moreira, Dias, Pereira, & Estevinho, 2008). میزان ترکیبات فنلی بره‌موم و درنتیجه ویژگی ضدمیکروبی آن به شدت وابسته به شرایط آب‌وهوایی و جغرافیایی محل‌هایی است که گیاه در آن ناحیه رشد می‌کند. Dias و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که نمونه‌هایی که محتوی فنلی و فلاونوئیدی بیشتر از ۲۳ درصد داشتند مربوط به سرزمین‌های گرم بودند. نتایج آنها با نتایج دیگر محققین (Choi *et al.*, 2006; Silva, Rodrigues, Feás, & Estevinho, 2012) قابل مقایسه بود. همچنین، Socha و همکاران (۲۰۱۱) مقادیر ترکیبات فنلی کل و نیز فلاونوئیدی بره‌موم از مناطق مختلف لهستان را اندازه‌گیری کردند که به‌طور میانگین مقدار ۱۷۳/۶۰ میلی‌گرم بر گرم و ۴۸/۸۴ میلی‌گرم بر گرم را به‌ترتیب برای ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدها به‌دست آوردند. آنها نتیجه گرفتند که رابطهٔ خطی میان مقدار این ترکیبات و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز ضدمیکروبی

[1] Near Infrared (NIR)

این ماده وجود دارد. Kalogeropoulos، Konteles، Troullidou، Mourtzinos و Karathanos (۲۰۰۹) گزارش کردند که محدودهٔ گسترده‌ای از فلاونوئید کل در برەموم مناطق مختلف یونان و قبرس دارای محتوی ۲/۵ تا ۱۷۶ میلی‌گرم بر گرم می‌باشد. همچنین، Kumazawa و همکاران (۲۰۰۴) مقدار کل فلاونوئید در برەموم اوکراین را به مقدار ۶۳/۷ میلی‌گرم بر گرم تعیین نمودند.

ازسوی‌دیگر محتوی آنتی‌اکسیدانی برەموم موردمطالعه ۶۰/۶۹ درصد به‌دست آمد (جدول ۱). این مقدار قابل‌مقایسه با مقادیر گزارش‌شده ازسوی‌دیگر محققین است. Lima و همکاران (۲۰۰۹) ویژگی‌های شیمیایی برەموم ازجمله ظرفیت مهار رادیکال آزاد در نمونه‌های ۶ منطقهٔ مختلف آرژانتین را بررسی کردند. مقدار فعالیت مهار رادیکال آزاد که برحسب بی‌رنگ‌شدن DPPH اندازه‌گیری شد در محدودهٔ ۴۶/۶۰ تا ۸۹/۵۰ در ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. ازسوی‌دیگر، Kumazawa و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی برەموم مناطق مختلف جغرافیایی، یعنی آرژانتین، استرالیا، برزیل، بلغارستان، شیلی، چین، مجارستان، نیوزیلند، آفریقای جنوبی، تایلند، اوکراین، اروگوئه، ایالات متحده آمریکا و ازبکستان را مقایسه نمودند. نتایج نشان داد نمونه‌های آرژانتین، استرالیا، چین، مجارستان و نیوزیلند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نسبتاً قوی داشتند و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با محتوای کلی پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها همبستگی داشت.

مقایسهٔ نتایج گزارش‌شده ازسوی‌دیگر محققین با مقادیر گزارش‌شده در مقالهٔ حاضر بیانگر مقدار پایین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در نمونهٔ برەموم موردمطالعه است. باتوجه‌به اینکه برەموم موردمطالعه از منطقهٔ کوه‌های هزارمسجد جمع‌آوری شده است و همچنین توجه به این نکته که استان خراسان رضوی در سال‌های اخیر با کاهش بارش و نزولات جوی روبه‌رو بوده است، احتمال داده می‌شود که شرایط آب‌وهوایی و جغرافیایی استان خراسان رضوی در سال‌های اخیر بر خصوصیات برەموم‌های منطقه تأثیر گذاشته باشد.

ویژگی‌های ضدمیکروبی عصارهٔ برەموم

آزمون‌ها نشان دادند که MIC برای عصارهٔ الکلی برەموم در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود درحالی‌که در غلظت به‌کاررفته برای باکتری *اشرشیاکلی* MIC به‌دست نیامد. همچنین با انجام آزمون MBC برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عدم رشد باکتری مشاهده نگردید. نتایج این آزمون‌ها بیانگر این مطلب بود که عصارهٔ الکلی برەموم بر باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) نسبت به باکتری گرم منفی (*اشرشیاکلی*) تأثیر بیشتری گذاشته است و همچنین نتیجه گرفته شد که عصارهٔ برەموم روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها اثر مهارکنندگی دارد و اثر کشندگی ندارد.

بررسی منابع حاکی‌از این است که حداقل غلظت کشندگی (MIC) عصارهٔ الکلی برەموم باتوجه‌به نوع میکروارگانیسم (باکتری، مخمر و کپک) متفاوت است و حتی در بین میکروارگانیسم‌های یک خانواده بسته به جنس و گونه ممکن است، متفاوت باشد (Kim, Pant, Sim, Lee, & Kim, 2014؛ ضیا، منانی، محمودی و بیات، ۱۳۸۸؛ مؤمن‌بیت‌الهی و همکاران، ۱۳۸۸؛ هاتفی، مهرابیان، نوحی و رفیعی‌طباطبایی، ۱۳۸۷). اونق و همکاران (۱۳۸۹) مقدار MIC را در نمونه‌های برەموم منطقهٔ آذربایجان برای میکروارگانیسم‌های *اشرشیاکلی* و *آسپیرجیلوس نایجر*[1] به‌ترتیب ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آوردند. درهمین‌راستا، شاهدی (۱۳۹۰) اثر ضدباکتریایی عصارهٔ الکلی برەموم به‌دست‌آمده از کندوهای منطقهٔ شهرکرد را روی ۶ باکتری مهم مولد عفونت و مسمومیت غذایی شامل *سالمونلا تیفی موریم*[2]، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروجینوزا*[3]، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*[4] و *باسیلوس سرئوس*[5] موردبررسی قرار دادند (شاهدی، ۱۳۹۰).

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که عصارهٔ الکلی برەموم روی باکتری‌های گرم مثبت تأثیر قابل‌توجهی داشت و تقریباً رشد همهٔ باکتری‌های موردآزمایش را به‌صورت معنی‌داری مهار کرد ($P<۰/۰۵$). برخلاف باکتری‌های گرم مثبت، برەموم بر رشد باکتری‌های گرم منفی تأثیر معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). Uzel و همکاران (۲۰۰۵) عصارهٔ اتانولی ۴ نمونه برەموم آناتولی را

[1] *Aspergillus niger*
[2] *Salmonella Typhimurium*
[3] *Pseudomonas aeruginosa*
[4] *Listeria monocytogenes*
[5] *Bacillus cereus*

مطالعه کردند و فعالیت ضدمیکروبی آن برحسب MIC تعیین شد. آنها دریافتند که هرچند نمونه‌های بره‌موم از مناطق مختلف آناتولی جمع‌آوری‌شده بودند، اما همهٔ نمونه‌ها فعالیت ضدمیکروبی مشابهی علیه باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها نشان دادند و بنابراین نتیجه گرفتند که بره‌موم می‌تواند از پوسیدگی دندان جلوگیری کند؛ زیرا فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی را علیه میکروارگانیسم‌هایی مانند *استرپتوکوک موتانس*[1]، *استرپتوکوکوس سوبرینوس*[2] و *کاندیدا آلبیکنس*[3] نشان می‌دهد که شامل بیماری‌های دهانی می‌شوند. این در حالی است که مقدار MIC تعیین‌شده برای عصارهٔ الکلی بره‌موم در این مطالعه در مقایسه با نتایج دیگر محققین بسیار بالاتر است و این امر می‌تواند به پایین‌بودن محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در این نمونه مربوط باشد.

تعیین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با HPLC

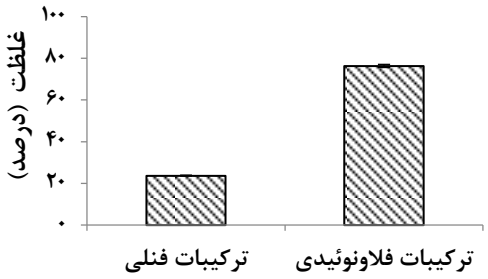
شناسایی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصارهٔ بره‌موم با کروماتوگرافی HPLC انجام شد. جدول (۳) ترکیبات جداسازی و شناسایی‌شدهٔ موجود را در عصارهٔ بره‌موم نشان می‌دهد. تعداد ترکیبات استخراج‌شده از عصارهٔ بره‌موم ۱۵ ترکیب بود. مقدار کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شناسایی‌شده در کروماتوگرام عصارهٔ بره‌موم ۵۸/۶۸۵ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمد. براساس داده‌های به‌دست‌آمده از HPLC در جدول (۳) مشاهده می‌گردد که بیشترین مادهٔ استخراج‌شده در عصاره مربوط به پینوسمبرین[4] (پیک شمارهٔ ۱۴) می‌باشد که مقدار ۸/۶۵۰ میلی‌گرم بر گرم (۱۴/۷۴ درصد) به‌دست آمد. نارینجنین[5] (پیک شمارهٔ ۹) که به لحاظ مقداری دومین ترکیب موجود در عصارهٔ بره‌موم بود نیز دارای مقدار ۸/۱۷۵ میلی‌گرم بر گرم (۱۳/۹۳ درصد) به‌دست آمد. دو ترکیب اسید فرولیک (پیک شمارهٔ ۵) و گالانجین[6] (پیک شمارهٔ ۱۵) در ردیف‌های ۳ و ۴ و به‌ترتیب با مقادیر ۵/۷۰ و ۵/۲۶ میلی‌گرم بر گرم (به‌ترتیب ۹/۷۱ و ۸/۹۵ درصد) قرار گرفتند و در رتبهٔ پنجم کرایسین[7] (پیک شمارهٔ ۱۳) با مقدار ۴/۹۲ میلی‌گرم بر گرم (۸/۳۸ درصد) قرار گرفت.

جدول ۳- ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی جداسازی و شناسایی‌شده با روش HPLC در عصارهٔ بره‌موم (میانگین±انحراف استاندارد)

مجموعهٔ ترکیبات		نام ترکیب	شمارهٔ پیک	غلظت (میلی‌گرم برگرم)
ترکیبات فنلی		گالیک اسید	۱	۱/۳۶±۰/۰۶
		کافئیک اسید	۲	۴/۸۷±۰/۰۲
		کاتکین	۳	۱/۹۸±۰/۵۰
		فرولیک اسید	۵	۵/۷۰±۰/۰۲
ترکیبات فلاونوئیدی	فلاونوئید	اپی‌کاتکین	۴	۱/۸۹±۰/۰۱
		کوماریک اسید	۸	۴/۴۹±۰/۱۰
	فلاون	کوئرستین- ۳- متیل- اتر	۷	۱/۷۰±۰/۰۳
		آپی‌جنین	۱۰	۴/۶۴±۰/۰۳
		لوتئولین	۱۲	۲/۱۰±۰/۰۴
		کرایسین	۱۳	۴/۹۲±۰/۲۰
	فلاونون	نارینجنین	۹	۸/۱۸±۰/۰۶
		پینوسمبرین	۱۴	۸/۶۵±۰/۱۱
	فلاونول	کوئرستین	۶	۱/۸۳±۰/۰۳
		کامفرول	۱۱	۱/۱۶±۰/۰۶
		گالانجین	۱۵	۵/۲۶±۰/۰۲

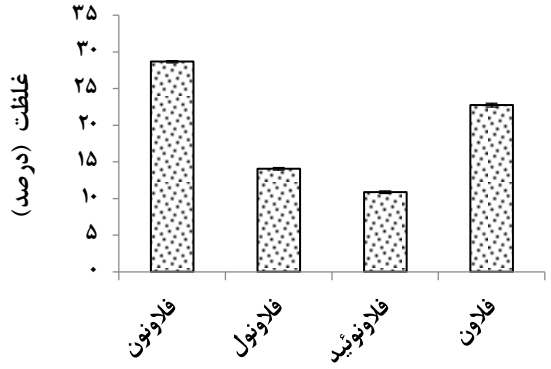
[1] *Streptococcus mutans*
[2] *Streptococcus sobrinus*
[3] *Candidate Albicans*
[4] Pinocembrin
[5] Naringenin
[6] Galangin
[7] Chrysin

شکل (۱) مجموعهٔ ترکیبات شناسایی‌شده در عصارهٔ اتانولی برەموم را با روش HPLC نشان می‌دهد. همان‌طورکه در شکل (۱) مشاهده می‌گردد بیشترین مقدار ترکیبات شناسایی‌شده به‌این‌وسیله مربوط به مجموعهٔ ترکیبات فلاونوئیدی (شامل فلاونون‌ها، فلاون‌ها، فلاونول‌ها و فلاونوئیدها) (۷۶/۳۲ درصد) می‌باشد درحالی‌که مقدار مجموعهٔ ترکیبات فنلی (شامل کاتکین و اسیدهای گالیک، فرولیک و کافئیک) ۲۳/۶۸ درصد به‌دست آمد. براساس این داده‌ها، مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کمی بیشتر از سه برابر ترکیبات فنلی موجود در نمونهٔ برەموم بود. لازم به ذکر است که تعدادی از ترکیبات موجود در هریک از این دو مجموعه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بودند که شامل کاتکین به‌عنوان ترکیب فنلی و اپی‌کاتکین و پینوسمبرین به‌عنوان ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در مجموع دارای مقداری در حدود ۲۱/۳۲ درصد بودند.



شکل ۱- مجموعهٔ ترکیبات شناسایی‌شده در عصارهٔ اتانولی برەموم به روش HPLC

در شکل (۲) مجموعهٔ ترکیبات فلاونوئیدی شناسایی‌شده با HPLC برحسب مقدارشان به تفکیک نشان داده شده‌اند. همان‌طورکه قبلاً اشاره شد این مجموعه شامل ۴ دسته ترکیبات (فلاون، فلاونوئید، فلاونل و فلاونون) بودند (جدول ۳). از شکل (۲) ملاحظه می‌گردد که بیشترین مقدار ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ مجموعهٔ ترکیبات فلاونوئیدی، فلاونون‌ها با مقدار ۲۸/۶۷ درصد هستند که شامل پینوسمبرین و نارینجنین می‌شوند. گروه بعدی فلاون‌ها با مقدار ۲۲/۷۵ درصد هستند. این دسته شامل ۴ ترکیب می‌شود که کرایسین و آپی‌جنین به‌ترتیب بیشترین مقدار را در این گروه دارند. در مرتبهٔ سوم گروه ترکیبات فلاونولی با مقدار ۱۴/۰۳ درصد قرار می‌گیرند و شامل ۳ ترکیب گالانجین، کوئرستین و کامفرول می‌باشد. در آخر رتبهٔ گروه فلاونوئیدها با مقدار ۱۰/۸۶ درصد هستند و شامل ۲ ترکیب کاتکین و اسید کوماریک می‌شوند. (جدول ۳).



شکل ۲- گروه‌های تشکیل‌دهندهٔ مجموعهٔ ترکیبات فلاونوئیدی شناسایی‌شده با HPLC

نتایج به‌دست‌آمده از شناسایی ترکیبات به روش HPLC برای عصارهٔ برەموم موردمطالعه در این تحقیق با نتایج دیگر محققین قابل‌مقایسه است. Yang و همکاران (۲۰۱۳) ترکیبات فنلی عصاره‌های برەموم چینی به کمک کروماتوگرافی HPLC جداسازی و شناسایی نمودند. براساس داده‌های آنها ترکیب‌های شناسایی‌شده (به‌ترتیب بیشترین مقدار بازیابی‌شده) عبارت است از گالانجین (۲/۷۸ میلی‌گرم بر گرم)، لوتئولین (۱/۱۷ میلی‌گرم بر گرم)، جنستئین (۰/۸۴ میلی‌گرم بر گرم)، کوئرستین (۰/۶۴ میلی‌گرم بر گرم)، روتین (۰/۴۰ میلی‌گرم بر گرم) و کورکومین (۰/۰۱ میلی‌گرم بر گرم) بودند. Kosalec، Bakmaz، Pepeljnjak و Vladimir-Knezevis (۲۰۰۴) عصارهٔ اتانولی برەموم از ناحیهٔ آدریاتیک کرواسی را به روش HPLC موردبررسی قرار دادند. این گروه فلاونوئیدهای پینوسمبرین، اسیدکافئیک، گالانجین و کرایسین را آنالیز کردند. نتایج آنها نشان داد که فلاونوئید غالب در تمامی نمونه‌ها پینوسمبرین است و مقدار آن از ۰/۰۳ تا ۶/۱۴ درصد گزارش شد. براساس یافته‌های این گروه نمونه‌های برەموم مناطق مختلف کرواسی محتوای فلاونوئیدهای کرایسین، پینوسمبرین، نارینجنین و گالانجین تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای نداشتند اما در مقدار اسیدکافئیک متفاوت بودند. همچنین، Bruschi و همکاران (۲۰۰۳) روشی بر پایهٔ HPLC و آشکارساز فرابنفش برای تعیین مقدار ترکیبات موجود در عصارهٔ برەموم توسعه داد. براساس روش آنها ناحیهٔ خطی جواب‌ها بر پایهٔ سنجش کرایسین در محدودهٔ ۰/۲۴ تا ۲/۴

میلی‌گرم بر گرم قرار می‌گرفت و نتایج بیانگر صحت، دقت و کارایی روش آنها بود. Pellati، Prencipe، Bertelli و Benvenuti (۲۰۱۳) با روش HPLC مقدار ترکیبات فنلی ۰/۵ تا ۰/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ترکیبات فلاونوئیدی ۱/۲ تا ۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آوردند، درحالی‌که ازطریق استخراج با مایکروویو مقدار ترکیبات فنلی کل از ۵/۰ تا ۱۲۰/۸ میلی‌گرم بر گرم و ترکیبات فلاونوئیدی کل از ۲/۵ تا ۱۶۸/۰ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمد.

تحقیق‌ها نشان می‌دهد که فعالیت ضدمیکروبی بره‌موم به‌وجود ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی موجود در آن بستگی دارد. به‌عنوان مثال Popravko، Gurevich و Kolosov (۱۹۶۹) دریافتند که فلاون‌های گالانجین و پینوسمبرین مشابه هم عمل می‌کنند و فعالیت ضدباکتری بالایی را نسبت به *باسیلوس سابتیلیس*[1]، *پروتئوس ولگاریس*[2] و *باسیلوس آلویه*[3] نشان داده‌اند درحالی‌که اثر آنها در مقایسه با *سالمونلا گالیناروم*[4]، *سالمونلا پولروم*[5] و *سالمونلا دوبلین*[6] کمتر و نسبت به سویه‌های مختلف *اشرشیاکلی* ناچیز بود. در واقع این محققین پی‌بردند که، گالانجین در غلظت‌های ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، باکتری *باسیلوس سابتیلیس* را به مدت ۱۲ ساعت مهار کرد. سطوح بالاتر (۰/۰۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) باعث کاهش رشد *ب. آلویه* برای ۲۴ ساعت و *پروتئوس ولگاریس* برای ۱۲ ساعت شد. اگرچه، این غلظت برای مهار *سالمونلا گالانیروم*[7] برای ۲۴ ساعت موردنیاز بود. همچنین، گروهی از محققین بیان کردند که پینوسمبرین باکتری *باسیلوس سابتیلیس* را به مدت ۲۴ ساعت در ۰/۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مهار می‌کند (Ghisalberti, 1979) و دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی نسبت به قارچ *آلترناریا*[8] است (Kosalec, Bakmaz, & Pepeljnjak, 2003; Kosalec *et al*., 2004). ازسوی‌دیگر گزارش شده است اسید کافئیک و اسید فرولیک دارای فعالیت ضدباکتری در برخی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند (Ghisalberti, 1979; Popravko *et al*., 1969).

براساس وجود بیشترین ترکیبات شناسایی‌شده در مطالعهٔ حاضر انتظار می‌رود که تأثیر ضدمیکروبی این نمونه بره‌موم بر بعضی از میکروارگانیسم‌ها برجسته‌تر باشد. باتوجه‌به اینکه بیشترین ترکیب‌های شناسایی‌شده در نمونهٔ بره‌موم موردمطالعه در این تحقیق پینوسمبرین و نارینجنین بود، لذا انتظار می‌رود که این نمونه نسبت به باکتری‌های اشاره‌شده (*باسیلوس سابتیلیس*، *پروتئوس ولگاریس* و *ب. آلویه*) و نیز برخی قارچ‌ها تأثیر مشابهی را نشان دهد. در واقع نمونهٔ بره‌موم موردمطالعه در این پژوهش نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ضدمیکروبی (MIC) نشان داد که این تأثیر به‌وجود پینوسمبرین در نمونه می‌تواند مرتبط باشد (Ghisalberti, 1979).

نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضدمیکروبی و نیز محتوی ترکیبات مؤثره در نمونهٔ بره‌موم ارزیابی شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده مهم‌ترین عناصر فلزی موجود در نمونهٔ بره‌موم حاصل از کندوهای استان خراسان رضوی شامل کلسیم، منیزیم، آهن، پتاسیم و سدیم بودند. مقدار ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدی موجود در نمونهٔ بره‌موم موردمطالعه به‌ترتیب ۴۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم و ۲۶/۴۰ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمد. همچنین، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد درحالی‌که در غلظت به‌کاررفته برای باکتری *اشرشیاکلی* MIC به‌دست نیامد. براین‌اساس، نمونهٔ بره‌موم موردمطالعه اثر ضدمیکروبی بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان داد. این نتایج بیانگر این است که فعالیت ضدمیکروبی بره‌موم تحت‌تأثیر مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در نمونهٔ موردمطالعه بوده است. به‌طورکلی این مطالعه نشان داد بره‌موم پتانسیل بالایی جهت استفاده به‌عنوان افزودنی ضدمیکروبی یا نگهدارنده در مواد غذایی و همچنین مکمل‌های آنتی‌بیوتیکی غذایی و غذا-داروها دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از صندوق حمایت از پژوهشگران معاونت علمی ریاست جمهوری برای حمایت‌های مالی پروژهٔ مرتبط (با شمارهٔ ۹۳۰۴۲۳۶۵) تشکر می‌کنند.

[1] *Bacillus subtilis*
[2] *Proteus vulgaris*
[3] *B. alvei*
[4] *Salmonella gallinarum*
[5] S. *pullorum*
[6] S. *dublin*
[7] *S. gallinarum*
[8] *Alternalia*

منابع

اشراقی، س.س. و والافر، ش. (۱۳۸۲). بررسی اثرات ضدباکتریایی بره موم (Propolis) کندوی عسل بر گونه های بیماریزای نوکاردیا. *مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید صدوقی یزد*، ۱۱(۲)، ۴۲-۴۸.

اونق، ع.، توکمهچی، ا.، حسامی، م.ا. و ابراهیم‌زاده، س.ا. (۱۳۸۹). GC-MS مطالعه تاثیر عصاره الکلی بره موم (پروپولیس) حاصل از کندوهای زنبور عسل آذربایجان غربی علیه رشد قارچهای درماتوفیت و غیر درماتوفیت و آنالیز ترکیبات سازنده آن با روش GC-MS. *مجله پزشکی ارومیه*، ۲۱(۳)، ۲۰۶-۲۱۴.

تیموری، م. (۱۳۸۸). تجزیه اسانس و بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه مرزه Satureja bachtiarica (Bunge.) در استان اردبیل. *فیزیولوژی محیطی گیاهی (پژوهش های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران)*، ۴(۲)، ۱۹-۲۶.

رضوی زاده، ب.ب.م. و نیازمند، ر. (۱۳۹۷). تاثیر روش‌های استخراج خیساندن و فراصوت بر محتوای ترکیبات فنلی بره موم. *فناوری‌های نوین غذایی*، ۶(۲)، ۲۹۳-۳۰۴. doi:https://doi.org/10.22104/jift.2019.3161.1766

شاهدی، م. (۱۳۹۰). بررسی اثر ضد باکتری عصاره الکلی بره موم بر برخی باکتری های بیماری زای غذازاد، (رساله دکتری منتشرنشده). دانشگاه شهرکرد، دانشگده دامپزشکی.

ضیایی‌لائین، ا. (۱۳۹۱). گیاهان دارویی هزار مسجد (مشاهده شده در ۱۰ دی ۱۳۹۷)، قابل دسترسی در درگاه الکترونیکی http://haval.blogfa.com/category

ضیا، م.ع.، منانی، ر.، محمودی، م. و بیات، م. (۱۳۸۸). بررسی تاثیر عصاره الکلی بره موم (پروپولیس) حاصل از کندوهای زنبور عسل ایران بر رشد تریکوفیتون منتاگروفایتیس، تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون وروکوزوم. *مجله دانشکده پزشکی اصفهان*، ۲۷(۹۵)، ۲۳۲-۲۴۱.

علی. (۱۳۹۵). معرفی بعضی از گیاهان دارویی منطقه کلات نادر (مشاهده شده در ۱۰ دی ۱۳۹۷)، قابل دسترسی در درگاه الکترونیکی http://koohnavardforood.blogsky.com

مؤمن‌بیت‌الهی، ج.، بهرامی، ن.، منصوریان، آ.، اسماعیلی، م.، امانلو، م. و محمدنیا، ع. (۱۳۸۸). بررسی اثر ضد میکروبی عصاره بره موم (Propolis) بر شایع‌ترین میکروارگانیسم های آسیب زای دهان (*کاندیدا آلبیکانس، استرپتوکوک موتانس، اکتینوباسیلوس*) در شرایط آزمایشگاهی. *مجله دندانپزشکی (جامعه اسلامی دندانپزشکان ایران)*، ۲۱(۱)، ۳۳-۳۹.

نشوه، م. و ناظری، س. (خرداد، ۱۳۹۳). فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی بره موم بر ضد باکتریهای بیماریزای انسانی. ارائه شده در اولین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران، تهران، ۳-۵ خرداد، مشاهده شده در https://www.civilica.com/Paper-BSCONF01-BSCONF01_594.html.

هاتفی، م.، مهرابیان، ص.، نوحی، ا.ا. و رفیعی‌طباطبایی، ر. (۱۳۸۷). بررسی خواص ضدجهش زایی عصاره الکلی بره‌موم به وسیله سالمونلا تیفی‌موریوم و میکروزوم. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، ۱۱(۲)، ۱۰۲-۱۱۰.

Aamer, A., Abdul-Hafeez, M., & Sayed, S. M. (2014). Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of Honey and Bee Propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) Staphylococcus sp. Isolated from Bovine Clinical Mastitis. *Alternative & Integrative Medicine, - 3*(4), 1-5.

Ali. (2016). Introduction of Some Medicinal Herbs of Kalate Nader region Retrieved from http://koohnavardforood.blogsky.com (in Persian)

Association of Official Analytical, C., & Helrich, K. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, VA: The Association.

Bankova, V. S., Castro, S. L. d., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, *31*(1), 3-15. doi:https://doi.org/10.1051/apido:2000102

Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*, *15*(7), 561-571. doi:https://doi.org/10.1002/ptr.1029

Bruschi, M. L., Franco, S. L., & Gremião, M. P. D. (2003). Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *26*(14), 2399-2409. doi:https://doi.org/10.1081/JLC-120023254

Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M., & Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*, *39*(7), 756-761. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.05.015

Dias, L. G., Pereira, A. P., & Estevinho, L. M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(12), 4246-4253. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.056

Eshraghi, S., & Valafar, S. (2003). Stugy of antibacterial effects of propolis honeybee hive on Nocardia pathogens. *Journal Of Shahid Sadoughi University Of Medical Sciences And Health Services*, *11*(2), 42-48 .(in Persian)

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, *60*(2), 59 .84- doi:https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738

González-Martín, M. I., Escuredo, O., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., Coello, M. C., Riocerezo, C. P., & Moncada, G. W. (2015). Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *15*(11), 27854-27868. Retrieved from doi:https://doi.org/10.3390/s151127854

Hatefi, M., Mehrabian, S., Nouhi, A., & Rafiee Tabatabaee, R. (2008). Survey of antimutagenic effects of ethanolic extract of propolis by Salmonella typhymurium/microsome *Journal of Arak University of Medical Sciences*, *11*(2), 102-110 .(in Persian)

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., & Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, *116*(2), 452-461. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.060

Kartal, M., Kaya, S., & Kurucu, S. (2002). *GC-MS Analysis of Propolis Samples from Two Different Regions of Turkey*, 57(9-10), 905-909.

Kim, J. I., Pant, H. R., Sim, H. J., Lee, K. M., & Kim, C. S. (2014). Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, *44*(Supplement C),52-57 doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.062

Kosalec, I., Bakmaz, M., & Pepeljnjak, S. (2003). Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharm*, *53*(4), 275-285 .

Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezevis, S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*, *54*, 65-72 .

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal Ethnopharmacol*, *64*(3), 235-240. doi:https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7

Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, *84*(3), 329-339. doi:https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4

Lima, G., Lopes, T., Rossetto, M. R., & Vianello, F. (2009). *Nutritional composition, phenolic compounds, nitrate content in eatable vegetables obtained by conventional and certified organic grown culture subject to thermal treatment* (Vol. 44).

Mello, B. C. B. S., Petrus, J. C. C., & Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, *96*(4), 533-539. doi:https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.040

Moemen Beitullah, J., Mansourian, A., Ismaili, M., Amanluo, M., Mohammadnia, A., & Bahrami, N. (2008). Study of Antimicrobial activity of Propolis extract on the most common oral pathogen microorganisms (*Candida albicans, Streptococcus mutans, Actinobacillus*) in vitro. *Journal of Dentistry (Islamic Society of Iranian Dentists)*, *21*(1), 33-39 .(in Persian)

Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., & Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(11), 3482-3485. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025

Nashveh, M., & Nazeri, S. (2015, May). *Antibacterial activity of ethanolic extract of propolis against human pathogenic bacteria*. Paper presented at the 1st National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran, 24-26 May 2015, Tehran, Iran. https://www.civilica.com/Paper-BSCONF01-BSCONF01_594.html (in Persian)

Onogh, A ,.Tokmehchi, A., Adib Hesami, M., & Ebrahimzadeh, S. (2010). Study of the effect of alcoholic extract of propolis from west azarbaijan honeybee hives on growth of dermatophytes and non-dermatophytes fungis and analysis of its compound by method.of GC-MS .*Urmia Medical Journal*, *21*(3), 206-214 .(in Persian)

Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D., & Benvenuti, S. (2013). An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *81-82*, 126-132. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.003

Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., & Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine, 12*(3), 221-228. doi:https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007

Popravko, S. A., Gurevich, A. I., & Kolosov, M. N. (1969). Flavonoid components of propolis. *Chemistry of Natural Compounds, 5*(6), 397-401. doi:https://doi.org/10.1007/BF00568574

Razavizadeh, B. M., & Niazmand, R. (2019). The Effect of Maceration and Ultrasound Extraction Methods on the Content of Phenolic Compounds of Propolis. *Innovative Food Technologies, 6*(2), 293-304. doi:https://doi.org/10.22104/jift.2019.3161.1766 (in Persian)

Ristivojević, P., Dimkić, I., Trifković, J., Berić, T., Vovk, I., Milojković-Opsenica, D., & Stanković, S. (2016). Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC ,HPTLC, Bioautography and Chemometrics. *PLOS ONE, 11*(6), e0157097. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157097

Saturnino da Silva AraÚJo, K., Francisco dos Santos JÚNior, J., Sato, M., Abadio Finco, F., Soares, I., dos Santos Barbosa, R., . . . Maria Botelho Mariano, S. (2016). *Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apisfrom two regions of Tocantins, Brazil* (Vol. 46).

Serra Bonvehí, J., Ventura-Coll, F., & Escolà Jordà, R. (1994). *The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics* (Vol. 71).

Shahedi, M. (2012). *Antibacterial effect of propolis on some food borne pathogen bacteria.* (Unpublished doctoral dissertation), Shahrekord University, Faculty of Veterinary Medicine. (in Persian)

Silva, J. C., Rodrigues, S., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology, 50*(5), 1790-1795. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.097

Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Gałkowska, D., Fortuna, T., & Witczak, T. (2011). Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International Journal of Food Science & Technology, 46*(3), 528-534. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02517.x

Teimori, M. (2009). Essential oil analysis and antibacterial activity of Satureja bachtiarica Bunge. in Ardebile province. *Journal on Plant Science Researches, 4*(2), 19-26 .(in Persian)

Tosi, E. A., Ré, E., Ortega, M. E., & Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli. *Food Chemistry, 104*(3), 1025-1029. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.011

Tosic, S., Stojanović, G., Mitic, S ,.Pavlović, A., & Alagić, S. (2017). *Mineral Composition of Selected Serbian Propolis Samples* (Vol. 61).

Uzel, A., Sorkun, K. y., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., Gençay, Ö., & Sali ̇h, B. r. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research, 160*(2), 189-195. doi:https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.01.002

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry, 106*(2), 804-810. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062

Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research, 37*(2), 99-105. doi:https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961

Yang, L., Yan, Q.-H., Ma, J.-Y., Wang, Q., Zhang, J.-W., & Xi, G.-X. (2013). High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in propolis. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 12*(5), 771-776. doi:https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i5.17

Ziae, M. A., Mannany, R., Mahmoudi, M., Bayat, M., & Mohaghegh, F. (2008). The effects of alcoholic extract of propolis obtained from iran bee hives on the growth of trichophyton mentagrophytis, trichophyton rubrum and trichophyton verrucosum. *Journal of Isfahan Medical School, 27*(95), 232-241 .(in Persian)

Ziaei, A. (2012). Medicinal Plants of Hezar Masjed region. Retrieved from http://haval.blogfa.com/category (in Persian)

Physicochemical and Antimicrobial Properties and Determination of Phenols and Flavonoids Content of Propolis from Bee Hives in Khorasan Razavi Province

BiBi Marzieh Razavizadeh[1*], Razieh Niazmand[2], Somayeh Hajinezhad[3], Ehsan Akbari[3]

1- Associate Professor, Department of Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
*Corresponding author (m.razavizadeh@rifst.ac.ir)
2- Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
3- PhD. Student, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

Abstract

In this research, the physicochemical and antimicrobial properties of propolis from honeybee beehives around Mashhad and the content of active compounds in propolis were determined by high pressure liquid chromatography (HPLC) both quantitatively and qualitatively. Physicochemical properties of the propolis sample (such as ash, moisture, soluble solids and insoluble solids and existing metal elements) were measured. The total phenolic and flavonoids compounds in the ethanolic extract of propolis were 40.126 mg/g (gallic acid) and 26.46 mg/g (quercetin), respectively. Antimicrobial tests showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract against *Staphylococcus aureus* was 100 mg/mL, while in the applied concentration MIC did not achieve against *Escherichia coli*. Also, the results of the minimum bactericidal concentration (MBC) test indicated that propolis extract on *Staphylococcus aureus* had only inhibitory effects. Evaluation of the content of phenolic and flavonoid compounds in propolis extract by HPLC indicated that the flavonoid compounds included flavones (13.33 mg/g), flavonoids (6.375 mg/g), flavonols (8.235 mg/g) and flavanones (16.825 mg/g). Based on the results, propolis can be used in various food and pharmaceutical industries.

Keywords: Antimicrobial activity, Chromatography, Flavonoids, Phenolic compounds, Propolis