

خواص فیزیکیوشیمیایی، ضد میکروبی و محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بره‌موم کندوهای زنبور عسل استان خراسان رضوی

بی‌بی مرضیه رضوی‌زاده^{۱*}، راضیه نیازمند^۲، سمیه حاجی‌نژاد^۳، احسان اکبری^۳

۱- دانشیار، گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
 * نویسنده 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

چکیده

در این تحقیق ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و ضد میکروبی بره‌موم حاصل از کندوهای زنبور عسل شمال شهر مشهد و نیز محتوی ترکیبات مؤثره موجود در بره‌موم به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به‌طور کمی و کیفی تعیین گردیده است. ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی نمونه بره‌موم (مانند خاکستر، رطوبت، مواد جامد محلول و نامحلول و عناصر فلزی موجود) اندازه‌گیری شدند. مقدار ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدی در عصاره اتانولی بره‌موم به ترتیب ۴۰/۲۱۶ میلی‌گرم بر گرم (برحسب اسید گالیک) و ۲۶/۴۰ میلی‌گرم بر گرم (برحسب کوئرستین) به‌دست آمد. آزمون‌های ضد میکروبی نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود در حالی که در غلظت به‌کاررفته برای باکتری *شرشیاکلی* MIC به‌دست نیامد. همچنین، نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی (MBC) حاکی از آن بود که عصاره بره‌موم روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها اثر مهارکنندگی دارد. ارزیابی محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصاره بره‌موم به کمک HPLC نشان داد ترکیبات فلاونوئیدی شناسایی شده 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 به‌دست آمده می‌توان از بره‌موم در صنایع مختلف غذایی و دارویی استفاده کرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۰

واژه‌های کلیدی

بره‌موم
 ترکیبات فنلی
 ترکیبات فلاونوئیدی
 فعالیت ضد میکروبی
 کروماتوگرافی

مقدمه

۱۳۸۲؛ اونق، توکم‌هچی، حسامی، و ابراهیم‌زاده، ۱۳۸۹؛ مؤمن‌بیت‌الهی و همکاران، ۱۳۸۸). این ماده حاوی صمغ یا رزین گیاهان، موم، اسیدهای چرب ضروری، گرده 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

بره‌موم از تولیدات زنبور عسل است، حالت آن خمیری شکل و چسبناک می‌باشد، بویی مطبوع دارد و رنگ آن از سبز تا قهوه‌ای تیره متغیر است. بره‌موم به‌عنوان ماده ضد عفونی‌کننده و عاملی مؤثر در پیشگیری از ورود و شیوع بیماری‌ها در کندو بشمار می‌آید (Kumazawa, Hamasaka, & Nakayama, 2004؛ اشراقی و والا،

نمونه‌های مختلف بره‌موم جداسازی شوند، به‌ویژه که اکثر آنها فلاون، فلاونون و فلاونول هستند. تحقیق‌ها نشان‌دهنده است که میان مقدار کل فلاونوئیدها و فعالیت بیولوژیکی و ضد میکروبی در بره‌موم همبستگی معنی‌داری وجود دارد (Banskota, Tezuka, & Kadota, 2001; Kujumgiev *et al.*, 1999). علاوه بر این، مشخص شده است که فعالیت ضد میکروبی تنها به یک جزء (یا یک ترکیب فلاونوئیدی) مرتبط نمی‌باشد (Kujumgiev *et al.*, 1999; Serra, 1994; Bonvehí, Ventura-Coll, & Escolà Jordà, 1994). بلکه، به نظر 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 فیزیکی و شیمیایی و ضد میکروبی بره‌موم حاصل از کندوهای زنبور عسل منطقه شمال مشهد (استان خراسان رضوی) و نیز شناسایی ترکیبات مؤثره آن به روش کروماتوگرافی است.

مواد و روش‌ها

بره‌موم از مناطق اطراف مشهد (منطقه شمال مشهد، کوه‌های هزارمسجد، خراسان رضوی) تهیه گردید. پوشش گیاهی غالب کوه‌های هزارمسجد گون است و علاوه بر آن شامل گیاهانی از جمله خارستر، آنگوزه، بومادران، موسیر و کاکوتی می‌رویند (ضیایی لائین، ۱۳۹۱؛ علی، ۱۳۹۵). الکل اتیلیک (اتانول) با درجه تجاری ۹۶ درصد (شرکت تقطیر خراسان، ساخت ایران) خریداری شد. معرف فولین -سی کالچيو^۴ و اسید گالیک از شرکت سیگما-آلدردیج سفارش داده شدند. استانداردهای معتبر اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها برای کروماتوگرافی از شرکت سیگما-آلدردیج خریداری شدند.

محیط‌های کشت مولر هینتون آگار^۵ و کشت مولر هینتون برات^۶ (شرکت Himedia، ساخت فرانسه) خریداری گردید. بانک باکتری‌ها شامل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*^۷ (PTCC 1764) و *اشرشیاکلی*^۸ (PTCC 1330)، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی) تهیه شد.

الکل می‌تواند مواد قابل حل آن را جدا نماید. بخش بزرگی از بره‌موم که به راحتی 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 در دسترس زنبورها در مکان‌های مختلف بستگی دارد و این مسئله تحت تأثیر منشأ جغرافیایی و شرایط آب‌وهوایی آن منطقه بستگی دارد. به عنوان مثال، در بره‌موم مناطق معتدل، بیشترین ترکیبات فعال بیولوژیکی پلی‌فنل‌ها، از جمله اسیدهای فنلیک و فلاونوئیدها هستند (Socha *et al.*, 2011; Tosic, 2005; Stojanović, Mitic, Pavlović, & Alagić, 2017; Uzel *et al.*, 2005). مهم‌ترین اجزای فعال فارماکولوژیکی موجود در بره‌موم عبارتند از فلاون‌ها، فلاونول‌ها، فلاونون‌ها^۱ (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 عصاره آن تهیه شود (Kumazawa *et al.*, 2004; Socha *et al.*, 2011; Tosi, Ré, Ortega, & Cazzoli, 2007).

استفاده تجاری اصلی بره‌موم به عنوان یک مکمل غذایی و درمانی می‌باشد. همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانی، فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد قارچ 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). استفاده روزافزون از بره‌موم نیاز به روش‌های مناسب برای تعیین کمی اجزای فعال آن دارد و از این رو، روش‌های کروماتوگرافی امکان جداسازی و اندازه‌گیری تمام اجزای آن را میسر می‌سازد (اونق و همکاران، ۱۳۸۹؛ رضوی زاده و نیازمند، ۱۳۹۷؛ Bruschi, Franco, & Gremião, 2003; Kartal, Kaya, & Kurucu, 2002).

برخی از تحقیق‌های انجام شده روی اجزاء بره‌موم نشان می‌دهد که مجموعه‌ای از ترکیبات جدا شده از بره‌موم به‌طور قابل توجهی با ترکیبات موجود در گیاهانی که زنبور عسل از آنها تغذیه می‌کند مربوط هستند. از آنجاکه بزرگ‌ترین گروه از ترکیبات موجود در گیاه رنگدانه‌های فلاونوئیدی هستند، انتظار می‌رود که همان ترکیبات از

⁴ Folin-Ciocaltue

⁵ Muller Hinton Agar (MHA)

⁶ Muller Hinton Broth (MHB)

⁷ *Staphylococcus Aureus*

⁸ *Escherichia Coli*

¹ Flavons

² Flavonols

³ Flavonones

آماده سازی 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 به دست آمده برای استفاده های بعدی در ظرف در بسته و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شد.

تهیه عصاره اتانولی برهموم

مقدار ۳۰ گرم از برهموم خام پودر شده به یک ارلن با ظرفیت ۵۰۰ میلی لیتر منتقل شد و ۱۰۰ میلی لیتر 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 اعمال شده، مخلوط تهیه شده توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و به کمک پمپ خلأ دو بار صاف گردید. محلول صاف شده در ظروف پتری دیش ریخته شد و این ظروف در محل تاریک و دور از نور و در دمای محیط قرار داده شد تا حلال حذف گردد. عصاره خشک شده برای استفاده های بعدی در ظرف شیشه ای تیره و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Popova, Silici, Kaftanoglu, & Bankova, 2005).

تعیین ویژگی های برهموم

تعیین ویژگی های فیزیکوشیمیایی

برای تعیین رطوبت برهموم، ۵ گرم برهموم خام پودر شده در یک گرم کن الکتریکی (Memert، مدل UF55، ساخت آلمان) در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد برای ۱ ساعت خشک شد (Dias, Pereira, & Estevinho, 2012). بعد از این مدت، آن را تا دمای اتاق خنک و توزین کرده و دوباره عملیات گرم خانه گذاری تا رسیدن به وزن ثابت تکرار شد. محتوی رطوبت براساس رابطه (۱) تعیین گردید:

رابطه (۱)

$$\text{رطوبت (درصد)} = 100 \times (A1 - A2) / A1$$

در رابطه (۱)، A1: وزن نمونه و A2: وزن نمونه خشک شده می باشد.

مقدار مواد جامد محلول و نامحلول در نمونه برهموم با حلال اتانول تعیین شد (Dias et al., 2012). به این ترتیب که به ۱ گرم از پودر برهموم خام ۲۵۰ میلی لیتر اتانول اضافه شد. مخلوط با یک همزن مغناطیسی (IKA،

RH.basic2، ساخت آلمان) هم زده شد و پس از ۳۰ دقیقه، محلول صاف شده 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 رابطه های (۲) و (۳) به دست آمد.

رابطه (۲)

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

رابطه (۳)

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

pH برهموم به کمک PH متر (Adwa، AD8000، ساخت رومانی) در محلول تهیه شده با ۱۰ گرم برهموم خام پودر شده در ۷۵ میلی لیتر متانول، با استفاده از متانول به عنوان کنترل اندازه گیری شد (Dias et al., 2012). کالیبراسیون با سه محلول بافر استاندارد انجام شد.

برای تعیین محتوای خاکستر برهموم (شامل مواد معدنی و مواد غیر معدنی دیگر)، مقدار ۵ گرم برهموم خام پودر شده در یک ظرف پلاتینی خشک گردید (Dias et al., 2012). برای انجام این کار، نمونه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت و حذف کامل رطوبت نگهداری شد، سپس در کوره الکتریکی (Exction، مدل TZ4ST، ساخت ایران) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا زمانی که کاملاً به خاکستر سفید تبدیل شد. محتوای خاکستر کل، به صورت درصد باقی مانده پس از اکسیداسیون خشک از رابطه (۴) محاسبه شد.

رابطه (۴)

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

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

اندازه گیری 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 پودر شده ۷۵ میلی لیتر متانول اضافه شد. مخلوط در فریزر (۲۰- درجه سانتی گراد) یک شب کامل قرار گرفت. پس از آن، محلول فیلتر شد تا موم به دست آید. مقدار موم با استفاده از نمونه وزن (SW) و وزن موم (WW) و مطابق

استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج براساس میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک بیان گردید.

تعیین ترکیبات آنتی اکسیدانی

۰/۲۵ گرم از عصاره را وزن کرده و با اتانول ۷۰ درصد به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. به ۲ میلی لیتر از محلول آماده شده ۲ میلی لیتر معرف ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل^۱ (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 نمونه شاهد نیز دقیقاً به همین صورت عمل گردید با این تفاوت که به جای نمونه از اتانول ۷۰ درصد استفاده گردید. محتوی ترکیبات آنتی اکسیدانی از رابطه (۶) محاسبه گردید (Wang, Sun, Cao, Tian, & Li, 2008).

رابطه (۶)

$$100 \times \left[\frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \right] = (\text{درصد}) \text{ ترکیبات آنتی اکسیدانی}$$

تعیین خاصیت ضد میکروبی بره موم

طبق تعریف کمترین غلظتی از بره موم که مانع رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش گردد (غلظت آخرین چاهکی که در آن هیچ کدورتی ایجاد نشده باشد) حداقل غلظت مهارکنندگی^۲ (MIC) نامیده می شود. در این مطالعه از روش برات میکرو دایلوژن^۳ برای تعیین MIC استفاده شد. به این ترتیب که از هر یک از سویه های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* در محیط مولر هینتون برات کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد تا سوسپانسیونی با غلظت 1×10^6 (واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر^۴) به دست آید. همچنین، از عصاره الکلی بره موم با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر رقت های متوالی در محیط برات تهیه شد و در میکروپلیت ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره ریخته شد. سپس ۹۵ میکرولیتر از محیط کشت برات و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. همچنین دو چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند که یکی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت برات با حلال (اتانول ۷۰

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

رابطه (۵)

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

تعیین ترکیبات فنلی کل

میزان ترکیبات فنلی کل براساس روش رنگ سنجی فولین-سیوکالچيو و برحسب اسید گالیک اندازه گیری شد. برای این منظور، ابتدا محلول های استاندارد با غلظت های (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر گرم) از اسید گالیک در اتانول ۷۰ درصد تهیه و از آنها ۰/۵ میلی لیتر برداشته با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین-سی کالچيو مخلوط و طی مدت ۰/۵ تا ۸ دقیقه، ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (وزنی/حجمی) به آن اضافه شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سپس جذب نوری آنها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (DR5000, Hach, ساخت آمریکا) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و نمودار استاندارد رسم شد (Association of Official Analytical & Helrich, 2009; Lima *et al.*, 1990). سپس، مقدار ۰/۰۵ گرم از عصاره خشک شده بره موم در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شد و سپس ۱ میلی لیتر از محلول تهیه شده تا حجم ۱۰ میلی لیتر رقیق سازی شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از این محلول با ۲ میلی لیتر کربنات سدیم و ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین-سی کالچيو 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 میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره خشک محاسبه گردید (Lima *et al.*, 2009).

اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی

سنجش فلاونوئیدها براساس آزمون رنگ سنجی صورت گرفت (Popova *et al.*, 2005). بدین ترتیب که ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از عصاره اتانولی بره موم تهیه شده نهایی در قسمت ترکیبات فنلی کل به ۱ میلی لیتر از محلول ۲ درصد کلرید آلومینیوم ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در محل تاریک جذب آن در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. در این روش از کوئرستین (محلول آبی کوئرستین با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر گرم) به عنوان استاندارد

¹ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

² Minimum Inhibition Concentration

³ Broth micro dilution method

⁴ Colony Forming Unit

(NIST chromatography data base, Agilent) ساخت آمریکا) انجام گردید (Mello, Petrus, & Hubinger, 2010).

تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از طرح کاملاً تصادفی ساده در قالب آزمایش‌های فاکتوریل استفاده شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب^۵ نسخه ۱۶,۲,۴ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی^۶ در سطح اطمینان ۹۵ درصد، ($P < 0.05$) صورت گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰ رسم شد. لازم به ذکر است که کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی بره‌موم

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

ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی به‌دست‌آمده از نمونه بره‌موم مورد استفاده از قبیل رطوبت، خاکستر، مواد جامد محلول و نامحلول و pH قابل مقایسه با نتایج گزارش شده از سوی دیگر محققین است (Saturnino da Silva AraÚJo *et al.*, 2011; Socha *et al.*, 2016). این ویژگی‌ها نشان‌دهنده نوع منشأ گیاهی مورد استفاده و نیز خصوصیات منطقه آب‌وهوایی و جغرافیایی محصول بره‌موم است. Dias و همکاران (۲۰۱۲) مقدار خاکستر ۴ نوع بره‌موم جمع‌آوری شده 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

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 در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت‌ها پوشیده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌راد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر به کمک الیزاریدر (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^۱ (MBC) (حداقل غلظتی از بره‌موم که ۹۹/۹ درصد از تراکم اولیه باکتری را کاهش دهد) نیز انجام شد. برای این منظور 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 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از این مدت عدم رشد باکتری نشان‌دهنده MBC است (Aamer *et al.*, 2016; Ristivojević *et al.*, 2014؛ اونق و همکاران، ۱۳۸۹؛ تیموری، ۱۳۸۸).

تعیین محتوی ترکیبات فنلی به روش کروماتوگرافی

جداسازی و شناسایی ترکیبات فنلی عصاره بره‌موم به کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۲ (HPLC) (Agilent, HPLC 1100, ساخت آمریکا) همراه با آشکارساز آرایه دیودی^۳ در ۲۶۰ نانومتر انجام شد. برای این منظور 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 درجه سانتی‌گراد ثابت نگه‌داشته شد و پردازش کروماتوگرام‌ها با استفاده از نرم‌افزار رایانه کروماتوگرافی کم‌استیت^۴

¹ Minimum Bactericidal Concentration

² High Performance Liquid Chromatography

³ Diode Array

⁴ Chemstate

⁵ Minitab

⁶ Tukey

بسیار ناچیز بودند.

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

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

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی

فنل‌ها و فلاونوئیدها در بسیاری از ترکیبات طبیعی و از جمله بره‌موم یافت می‌شوند. این ترکیبات نه تنها اثرات آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند بلکه بر میکروارگانیزم‌ها نیز می‌توانند اثر گذاشته و باعث تخریب یا ممانعت از رشد آنها گردند. میزان کل ترکیبات فنلی و نیز محتوی ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه بره‌موم مورد استفاده به ترتیب ۴۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم (برحسب اسید گالیک) و ۲۶/۴۰ میلی‌گرم بر گرم (برحسب کوئرستین) به دست 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 در نتیجه ویژگی ضد میکروبی 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 به ترتیب برای ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدها به دست آوردند. آنها نتیجه گرفتند که رابطه خطی میان مقدار این ترکیبات و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز ضد میکروبی

بره‌موم را بین ۴/۶ تا ۱۶ درصد، محتوی 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 به دست آوردند. Woisky و Salatino (۱۹۹۸) مقدار خاکستر نمونه‌های بره‌موم برزیل (۴ منطقه 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 نمونه بره‌موم (میانگین ± انحراف استاندارد)

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

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 تعیین شده دارند. این مقادیر در توافق با مقادیر اعلام شده از سوی دیگر محققین می‌باشد (Tosic et al., 2017). Lima و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود روی نمونه‌های ۶ منطقه 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 مادون قرمز نزدیک^۱ کار کیفی روی تعداد ۹۱ نمونه بره‌موم (۵۲ نمونه از شیلی و ۳۹ نمونه از اسپانیا) انجام دادند و گستره 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 در حالی که عناصری مانند کروم، مس، روی، نیکل و سرب به مقدار

¹ Near Infrared (NIR)

میلی گرم بر میلی لیتر بود در حالی که در غلظت به کاررفته برای باکتری *اشرشیاکلی* MIC به دست نیامد. همچنین با انجام آزمون MBC برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عدم رشد باکتری مشاهده نگردید. نتایج این آزمون‌ها بیانگر این مطلب بود که عصاره الکلی بره‌موم بر باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) نسبت به باکتری گرم منفی (*اشرشیاکلی*) تأثیر بیشتری گذاشته است و همچنین نتیجه گرفته شد که عصاره بره‌موم روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها اثر مهارکنندگی دارد و اثر کشندگی ندارد.

بررسی منابع حاکی از این است که حداقل غلظت کشندگی (MIC) عصاره الکلی بره‌موم باتوجه به 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، مهربان، نوحی و رفیعی طباطبایی، ۱۳۸۷). اونق و همکاران (۱۳۸۹) مقدار MIC را در نمونه‌های بره‌موم منطقه آذربایجان برای میکروارگانیسم‌های *اشرشیاکلی* و *آسپیرجیلوس نایجر*^۱ به ترتیب ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آوردند. در همین راستا، شاهدی (۱۳۹۰) اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی بره‌موم به دست آمده از کندوهای منطقه شهرکرد را روی ۶ باکتری مهم مولد عفونت و مسمومیت غذایی شامل *سالمونلا تیفی* موریم^۲، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروجینوزا*^۳، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*^۴ و *باسیلوس سرئوس*^۵ مورد بررسی قرار دادند (شاهدی، ۱۳۹۰).

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که عصاره الکلی بره‌موم روی باکتری‌های گرم مثبت تأثیر قابل توجهی داشت و تقریباً رشد همه باکتری‌های مورد آزمایش را به صورت معنی داری مهار کرد ($P < 0.05$). برخلاف باکتری‌های گرم مثبت، بره‌موم بر رشد باکتری‌های گرم منفی تأثیر معنی داری نداشت ($P > 0.05$). Uzel و همکاران (۲۰۰۵) عصاره اتانولی ۴ نمونه بره‌موم اتانولی را

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

از سوی دیگر محتوی آنتی‌اکسیدانی بره‌موم مورد مطالعه ۶۰/۶۹ درصد به دست آمد (جدول ۱). این مقدار قابل مقایسه با مقادیر گزارش شده از سوی دیگر محققین است. Lima و همکاران (۲۰۰۹) ویژگی‌های شیمیایی بره‌موم از جمله ظرفیت مهار رادیکال آزاد در نمونه‌های ۶ منطقه مختلف آرژانتین را بررسی کردند. مقدار فعالیت مهار رادیکال آزاد که بر حسب بی‌رنگ شدن DPPH اندازه‌گیری شد در محدوده ۴۶/۶۰ تا ۸۹/۵۰ در ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود. از سوی دیگر، Kumazawa و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بره‌موم 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.

مقایسه نتایج گزارش شده از سوی دیگر محققین با مقادیر گزارش شده در مقاله حاضر بیانگر مقدار پایین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در نمونه بره‌موم مورد مطالعه است. باتوجه به اینکه بره‌موم مورد مطالعه از منطقه 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 بره‌موم‌های منطقه تأثیر گذاشته باشد.

ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره بره‌موم

آزمون‌ها نشان دادند که MIC برای عصاره الکلی بره‌موم در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقدار ۱۰۰

¹ *Aspergillus niger*

² *Salmonella Typhimurium*

³ *Pseudomonas aeruginosa*

⁴ *Listeria monocytogenes*

⁵ *Bacillus cereus*

کروماتوگرافی HPLC انجام شد. جدول (۳) ترکیبات جداسازی و شناسایی شده موجود را در عصاره بره‌موم نشان می‌دهد. تعداد ترکیبات استخراج شده از عصاره بره‌موم ۱۵ ترکیب بود. مقدار کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شناسایی شده در کروماتوگرام عصاره بره‌موم ۵۸/۶۸۵ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمد. براساس داده‌های به‌دست آمده از HPLC در جدول (۳) مشاهده می‌گردد که بیشترین ماده استخراج شده در عصاره مربوط به پینوسمبرین^۴ (پیک شماره ۱۴) می‌باشد که مقدار ۸/۶۵۰ میلی‌گرم بر گرم (۱۴/۷۴ درصد) به‌دست آمد. نارینجین^۵ (پیک شماره ۹) که به لحاظ مقداری دومین ترکیب موجود در عصاره بره‌موم بود نیز دارای مقدار ۸/۱۷۵ میلی‌گرم بر گرم (۱۳/۹۳ درصد) به‌دست آمد. دو ترکیب اسید فرولیک (پیک شماره ۵) و گالانجین^۶ (پیک شماره ۱۵) در ردیف‌های ۳ و ۴ و به ترتیب با مقادیر ۵/۷۰ و ۵/۲۶ میلی‌گرم بر گرم (به ترتیب ۹/۷۱ و ۸/۹۵ درصد) قرار گرفتند و در رتبه پنجم کرایسین^۷ (پیک شماره ۱۳) با مقدار ۴/۹۲ میلی‌گرم بر گرم (۸/۳۸ درصد) قرار گرفت.

مطالعه کردند و فعالیت ضد میکروبی آن برحسب MIC تعیین شد. آنها دریافتند که هرچند نمونه‌های بره‌موم از مناطق مختلف آنتولی جمع‌آوری شده بودند، اما همه نمونه‌ها فعالیت ضد میکروبی مشابهی علیه باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها نشان دادند و بنابراین نتیجه گرفتند که بره‌موم می‌تواند از پوسیدگی دندان جلوگیری کند؛ زیرا فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را علیه میکروارگانیسم‌هایی مانند *استرپتوکوک موتانس*^۱، *استرپتوکوکوس سوبرینوس*^۲ و *کاندیدا آلبیکانس*^۳ نشان می‌دهد که شامل بیماری‌های دهانی می‌شوند. این در حالی است که مقدار MIC تعیین شده برای عصاره الکلی بره‌موم در این مطالعه در مقایسه با نتایج دیگر محققین بسیار بالاتر است و این امر می‌تواند به پایین بودن محتوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در این نمونه مربوط باشد.

تعیین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با HPLC

شناسایی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره بره‌موم با

جدول ۳- ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی جداسازی و شناسایی شده با روش HPLC در عصاره بره‌موم (میانگین ± انحراف استاندارد)

مجموعه ترکیبات	نام ترکیب	شماره پیک	غلظت (میلی‌گرم بر گرم)
ترکیبات فنلی	گالیک اسید	۱	۱/۳۶ ± ۰/۰۶
	کافئیک اسید	۲	۴/۸۷ ± ۰/۰۲
	کاتکین	۳	۱/۹۸ ± ۰/۰۵
	فرولیک اسید	۵	۵/۷۰ ± ۰/۰۲
فلاونوئید	اپی کاتکین	۴	۱/۸۹ ± ۰/۰۱
	کوماریک اسید	۸	۴/۴۹ ± ۰/۱۰
	کوئرستین - ۳ - متیل - اتر	۷	۱/۷۰ ± ۰/۰۳
ترکیبات فلاونوئیدی	آپی جنین	۱۰	۴/۶۴ ± ۰/۰۳
	لوتئولین	۱۲	۲/۱۰ ± ۰/۰۴
	کرایسین	۱۳	۴/۹۲ ± ۰/۰۲
	نارینجین	۹	۸/۱۸ ± ۰/۰۶
فلاونون	پینوسمبرین	۱۴	۸/۶۵ ± ۰/۱۱
	کوئرستین	۶	۱/۸۳ ± ۰/۰۳
	کامفرول	۱۱	۱/۱۶ ± ۰/۰۶
	گالانجین	۱۵	۵/۲۶ ± ۰/۰۲

^۴ Pinocebrin

^۵ Naringenin

^۶ Galangin

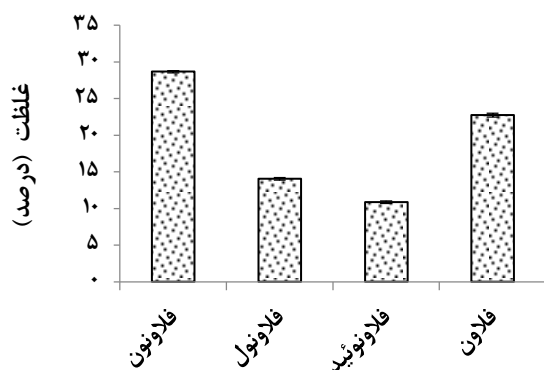
^۷ Chrysin

^۱ *Streptococcus mutans*

^۲ *Streptococcus sobrinus*

^۳ *Candida Albicans*

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 شناسایی شده با HPLC

نتایج به دست آمده از شناسایی ترکیبات به روش HPLC برای عصارهٔ بره‌موم مورد مطالعه در این تحقیق با نتایج دیگر محققین قابل مقایسه است. Yang و همکاران (۲۰۱۳) ترکیبات فنلی عصاره‌های بره‌موم چینی به کمک کروماتوگرافی HPLC جداسازی و شناسایی نمودند. براساس داده‌های آنها ترکیب‌های شناسایی شده (به ترتیب بیشترین مقدار بازایی شده) 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 بره‌موم از ناحیهٔ آدریاتیک کرواسی را به روش HPLC مورد بررسی قرار دادند. این گروه فلاونوئیدهای پینوسمیرین، اسیدکافئیک، گالانجین و کرایسین را آنالیز کردند. نتایج آنها نشان داد که فلاونوئید غالب در تمامی نمونه‌ها پینوسمیرین است و مقدار آن از ۰/۰۳ تا ۶/۱۴ درصد گزارش شد. براساس یافته‌های این گروه نمونه‌های بره‌موم مناطق مختلف کرواسی محتوای فلاونوئیدهای کرایسین، پینوسمیرین، نارینجین و گالانجین تفاوت قابل ملاحظه‌ای 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 بره‌موم توسعه داد. براساس روش آنها ناحیهٔ خطی جواب‌ها بر پایهٔ سنجش کرایسین در محدودهٔ ۰/۲۴ تا ۲/۴

شکل (۱) مجموعهٔ ترکیبات شناسایی شده در عصارهٔ اتانولی بره‌موم را با روش HPLC نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌گردد بیشترین مقدار ترکیبات شناسایی شده به این وسیله مربوط به مجموعهٔ ترکیبات فلاونوئیدی (شامل فلاونون‌ها، فلاون‌ها، فلاونول‌ها و فلاونوئیدها) (۷۶/۳۲ درصد) می‌باشد در حالی که مقدار مجموعهٔ ترکیبات فنلی (شامل کاتکین و اسیدهای گالیک، فرولیک و کافئیک) (۲۳/۶۸ درصد) به دست آمد. براساس این داده‌ها، مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کمی بیشتر از سه برابر ترکیبات فنلی موجود در نمونهٔ بره‌موم بود. لازم به ذکر است که تعدادی از ترکیبات موجود در هر یک از این دو مجموعه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بودند که شامل کاتکین به عنوان ترکیب فنلی و اپی‌کاتکین و پینوسمیرین به عنوان ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در مجموع دارای مقداری در حدود ۲۱/۳۲ درصد بودند.



شکل ۱- مجموعهٔ ترکیبات شناسایی شده در عصارهٔ اتانولی بره‌موم به روش HPLC

در شکل (۲) مجموعهٔ ترکیبات فلاونوئیدی شناسایی شده با HPLC برحسب مقدارشان به تفکیک نشان داده شده‌اند. همان‌طور که قبلاً اشاره شد این مجموعه شامل ۴ دسته ترکیبات (فلاون، فلاونوئید، فلاونول 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 پینوسمیرین و نارینجین می‌شوند. گروه بعدی فلاون‌ها با مقدار ۲۲/۷۵ درصد هستند. این دسته شامل ۴ ترکیب می‌شود که کرایسین و اپی‌جین به ترتیب 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

براساس وجود بیشترین ترکیبات شناسایی شده در مطالعه حاضر انتظار می‌رود که تأثیر ضد میکروبی این نمونه بره‌موم بر بعضی از میکروارگانیسم‌ها برجسته‌تر باشد. باتوجه‌به اینکه بیشترین ترکیب‌های شناسایی شده در نمونه بره‌موم مورد مطالعه در این تحقیق پینوسمیرین و نارینجین بود، لذا انتظار می‌رود که این نمونه نسبت به باکتری‌های اشاره شده (باسیلوس سابتیلیس، پروتئوس ولگاریس و ب. آلوویه) و نیز برخی قارچ‌ها تأثیر مشابهی را نشان دهد. در واقع نمونه بره‌موم مورد مطالعه در این پژوهش نسبت به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ضد میکروبی (MIC) نشان داد که این تأثیر به وجود پینوسمیرین در نمونه می‌تواند مرتبط باشد (Ghisalberti, 1979).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی و نیز محتوی ترکیبات مؤثره در نمونه بره‌موم ارزیابی شد. براساس نتایج به دست آمده مهم‌ترین عناصر فلزی موجود در نمونه بره‌موم حاصل از کندوهای استان خراسان رضوی شامل کلسیم، منیزیم، آهن، پتاسیم و سدیم بودند. مقدار ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدی موجود در نمونه بره‌موم مورد مطالعه به ترتیب ۴۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم و ۲۶/۴۰ میلی‌گرم بر گرم به دست آمد. همچنین، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد در حالی که در غلظت به کاررفته برای باکتری اشرشیاکلی MIC به دست نیامد. براین اساس، نمونه بره‌موم مورد مطالعه اثر ضد میکروبی بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان داد. این نتایج بیانگر این است که فعالیت ضد میکروبی بره‌موم تحت تأثیر مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در نمونه مورد مطالعه بوده است. به‌طور کلی این مطالعه نشان داد بره‌موم پتانسیل بالایی جهت استفاده به‌عنوان افزودنی ضد میکروبی 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 پروژه مرتبط (با شماره ۹۳۰۴۲۳۶۵) تشکر می‌کنند.

میلی‌گرم بر گرم قرار می‌گرفت و نتایج بیانگر صحت، دقت و کارایی روش آنها بود. Bertelli, Prencipe, Pellati 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 به دست آوردند، در حالی که از طریق 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 به دست آمد.

تحقیق‌ها نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی بره‌موم به وجود ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی موجود در آن بستگی دارد. به‌عنوان مثال Kolosov و Gurevich, Popravko (۱۹۶۹) دریافتند که فلاون‌های گالانجین و پینوسمیرین مشابه هم عمل می‌کنند و فعالیت ضد باکتری بالایی را نسبت به باسیلوس سابتیلیس^۱، پروتئوس ولگاریس^۲ و باسیلوس آلوویه^۳ نشان داده‌اند در حالی که اثر آنها در مقایسه با سالمونلا گالیناروم^۴، سالمونلا پولروم^۵ و سالمونلا دوبلین^۶ 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. آلوویه برای ۲۴ ساعت و پروتئوس ولگاریس برای ۱۲ ساعت شد. اگرچه، این غلظت برای مهار سالمونلا گالیناروم^۷ برای ۲۴ ساعت مورد نیاز بود. همچنین، گروهی از محققین بیان کردند که پینوسمیرین باکتری باسیلوس سابتیلیس را به مدت ۲۴ ساعت در ۰/۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مهار می‌کند (Ghisalberti, 1979) و دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی نسبت به قارچ آلترناریا^۸ است (Kosalec, Bakmaz, & Pepeljnjak, 2003; Kosalec et al., 2004). از سوی دیگر گزارش شده است اسید کافئیک و اسید فرولیک دارای فعالیت ضد باکتری در برخی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند (Ghisalberti, 1979; Popravko et al., 1969).

¹ *Bacillus subtilis*

² *Proteus vulgaris*

³ *B. alvei*

⁴ *Salmonella gallinarum*

⁵ *S. pullorum*

⁶ *S. dublin*

⁷ *S. gallinarum*

⁸ *Alternaria*

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.، توکمچهچی، 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 روش های استخراج خیساندن و فراصوت بر محتوای ترکیبات فنلی بره موم. فناوری های نوین غذایی، ۲(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 منتشر نشده). دانشگاه شهرکرد، دانشگده دامپزشکی.
- ضیایی لائین، 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 زوبروم 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://koohtnavardforood.blogspot.com>
- مؤمن بیت الهی، ج.، بهرامی، ن.، منصوریان، آ.، اسماعیلی، م.، امانلو، م. و محمدنیا، ع. (۱۳۸۸). بررسی اثر ضد میکروبی عصاره بره موم (Propolis) بر شایع ترین میکروارگانسیم های آسیب زای دهان (کاندیدا/آلبیکانسی، استریپتوکوک 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.، مهربان، ص.، نوحی، ا.ا. و رفیعی طباطبایی، ر. (۱۳۸۷). بررسی خواص ضدجوش زایی عصاره الکلی بره موم به وسیله سالمونلا تیپی موریوم 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://koohtnavardforood.blogspot.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). Study 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 typhimurium/microsome *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 11(2), 102-110 .(in Persian)
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, 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 .
- Kujungiev, 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](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](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 fungus 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 Apis from 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., & Witzak, 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., Öncü, 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 Niazmand², Somayeh Hajinezhad³, Ehsan Akbari³

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