دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و پنجم، شماره ۲، صفحه ۱۵۵-۱۳۰ (خرداد و تیر ۱۴۰۱)

Iran South Med J 2022; 25(2): 130-155

ارزیابی برخی خصوصیات فیتوشیمی، نوتریسیتیکال و ضدمیکروبی عصاره میوه رملک (*Ziziphus nummularia*)

قاسم احمدی (MSc)[1*]، طاهره خلیفه (MSc)[1]، نبی‌اله مبارکی (PhD)[1]، غلامحسین محبی(PhD)[1**]، علیرضا برمک (PhD)[1]

[1] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران .

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵- پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۳/۱۰)

چکیده

زمینه: گرایش‌های اخیر به غذاهای عملگرا و ترکیبات غذا- دارویی، بیانگر نقش مهم مولکول‌های زیست‌فعال در درمان بیماری‌های انسانی است. در مطالعه اخیر، برخی خصوصیات فیتوشیمیایی و غذا- دارویی عصاره میوه زیزیفوس نومولاریا برداشت شده از جنگل‌های پشت‌پر دشتستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و محتوای فنلی کل عصاره میوه زیزیفوس نومولاریا با اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. متابولیت‌های ثانویه آن با روش GC-MS شناسایی گردیدند. فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی آن با استفاده از روش میکرودیلوشن در برابر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس، باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی، قارچ آسپرژیلوس نایجر و مخمر کاندیدا آلبیکنس، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: آنالیز GC-MS نمونه، تعداد ۵۱ ترکیب شیمیایی با ساختارهای شیمیایی و زیست‌فعال مختلف مانند آلکالوئیدها، ترپن‌ها و استروئیدها را نشان داد. براساس نتایج، عصاره زیزیفوس فعالیت مهاری و کشنده قابل توجهی را در برابر سویه‌های میکروبی مورد مطالعه نشان داد و عصاره، دارای بیشترین فعالیت ضدمیکروبی در برابر مخمر کاندیدا آلبیکنس بود. وجود ترکیبات ضد میکروبی شناسایی شده توسط GC-MS، نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره را تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، عصاره زیزیفوس نومولاریا می‌تواند منبع زمینی مناسبی از ترکیبات ضدمیکروبی با عملکرد قابل‌توجهی در برابر پاتوژن‌های غذایی باشد. براساس مطالعات، متابولیت‌های ثانویه عصاره زیزیفوس، دارای اثرات نوتریسیتیکال و بیولوژیکی بالقوه‌ای هستند که به مطالعات آزمایشگاهی بیشتری نیازمند است.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدانی، زیزیفوس نومولاریا، کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی، ضدمیکروبی، نوتریسیتیکال

** بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

E.mail: mohebbihsn@yahoo.com
*** ORCID: 0000-0003-1680-8162**
**** ORCID: 0000-0003-3393-702X**

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها، از قرن‌ها پیش مورد توجه بشر بوده‌اند. امروزه بخش عظیمی از داروها، دارای منشاء سنتزی و شیمیایی می‌باشند. هرچند، تخمین زده می‌شود که حدود یک سوم فرآورده‌های دارویی، دارای منشاء گیاهی می‌باشند (۱). گیاه کُنار[1] (عناب، سدر، رملک)، از درختان و درختچه‌های تیغ‌دار همیشه‌سبز از تیره عنابیان[2] است که در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان پراکنده و در استان‌های جنوبی ایران به خوبی می‌روید (۲). گونه‌های کنار و توده‌های خودرو و بومی، مهم‌ترین منابع ژرم‌پلاسم[3] این گیاه به‌شمار می‌آیند و به دلیل داشتن ژن‌های مفید فراوان نظیر ژن‌های مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۳). مطالعات در زمینه گیاه‌شناسی و دارویی درخت سدر در کشورهای مختلف نشان داده‌اند که این گیاهان دارای اثرات فارماکولوژیکی قابل ملاحظه‌ای می‌باشند (۴)؛ به‌طوری‌که گونه‌های بومی رملک، به دلیل غنای ترکیبات زیست‌فعال با اثرات نوتریسیتیکال، از زمان کهن در طب سنتی جهت بهبود برخی بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۵).

رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال‌اکسیژن ROS[4]، در صورت تولید در زمان مناسب، بخش ضروری از حیات بوده و در واکنش‌های بیولوژیک مهمی شرکت دارند (۶)؛ در صورت تولید نامناسب، اثرات سوء خود را اعمال نموده و با اکسیداسیون ترکیبات حیاتی سلول نظیر اسیدهای‌چرب، پروتئین‌ها، اسیدهای‌نوکلئیک و رنگدانه‌ها، سبب ایجاد صدمات بافتی جبران‌ناپذیری می‌گردند (۷). با وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد مازاد در بدن نمی‌باشد و تأمین منابع خارجی آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه از طریق منابع غذایی ضرورت می‌یابد (۸). گسترش روزافزون مقاومت سویه‌های میکروبی به داروها و آنتی‌بیوتیک‌های صناعی و اثرات سمیت و سرطان‌زایی برخی از این ترکیبات، موجب جایگزینی آن‌ها با ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی شده است (۹). شواهدی از اثرات سوء تغذیه‌ای و توکسیک آنتی‌اکسیدان‌های صناعی همچون بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA)[5]، بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT)[6] و ترت بتاهیدروکسی‌کینون TBHQ[7] وجود دارند (۱۰)؛ بنابراین، نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های قوی با سمیت کمتر و اثربخشی بیشتر یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر است. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با عوارض جانبی کمتر، می‌توانند موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی پلاسما و در نتیجه کاهش ابتلا به برخی بیماری‌ها گردند (۱۱). در سه دهه گذشته، طیف گسترده‌ای از ترکیبات طبیعی گیاهی به‌منظور محافظت از بافت‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش خطرات ناشی آن‌ها در انسان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۲). یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنولی گیاهی می‌باشند که در پاسخ به استرس‌های محیطی تولید می‌گردند و

[1] *Ziziphus mauritiana*
[2] Rhamnaceae
[3] Germplasm
[4] Reactive Oxygens Species
[5] Butyl Hydroxy anisole
[6] Butyl Hydroxy Toluene
[7] Tert-Butylhydroquinone

نقش مهمی در حفاظت بافت‌ها در مقابل اثرات اکسندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر گونه‌های فعال ایفاء می‌نمایند (۱۳). برخی از مطالعات، اثرات آنتی‌اکسیدانی و درمان بیماری‌های قلبی را در زیزیفوس جوجوبا به ترکیبات فنولی و تانن‌های متراکم نسبت می‌دهند (۱۴). میوه کنار به دلیل غنای ترکیبات فنولی گوناگون، یک ترکیب آنتی‌اکسیدان قوی است که قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بوده و برخلاف آن‌ها، هیچ‌گونه عوارضی بر عملکرد کبد و کلیه ندارد (۱۵). در سال‌های اخیر، به‌دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تعداد زیادی از گونه‌های میکروبی و اثرات نامطلوب ناشی از مصرف بالای مواد آنتی‌بیوتیکی و ضرورت بازگشت به استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی گیاهان دارویی، توجه اهالی علم و صنعت را به خود جلب نموده است (۱۶). ترکیبات فیتوشیمی حاصل از عصاره‌های مختلف میوه، هسته و برگ کنار، علاوه بر پتانسیل قوی پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، دارای خاصیت ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضدقارچی نیز می‌باشند (۱۷). استفاده از میوه کنار به‌صورت تازه و خشک، دارای اثرات تب‌بر، ضداسهال و قابض بوده و در تسکین دردهای معده و دندان قدمت زیادی دارد. عصاره آبی میوه زیزیفوس موریتانی در فعالیت‌های کاهش قندخون و محافظت‌کنندگی کبد نقش داشته‌است (۱۸).

با توجه به اثرات ارزشمند درمانی و زیست‌پزشکی این گونه گیاهی و از طرفی وجود فراوان درختچه‌های وحشی رملک در جنگل‌های کوهپایه‌ای زاگرس واقع در منطقه پشت‌پر شهرستان دشتستان، انجام مطالعات با اهداف زیست غذا-دارویی، می‌تواند موجبات استفاده گسترده‌تر و هدفمندتر از میوه این گیاهان ارزشمند را فراهم آورد؛ لذا در این مطالعه ترکیبات شیمیایی و خواص نوتریسیتیکال، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی میوه رملک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

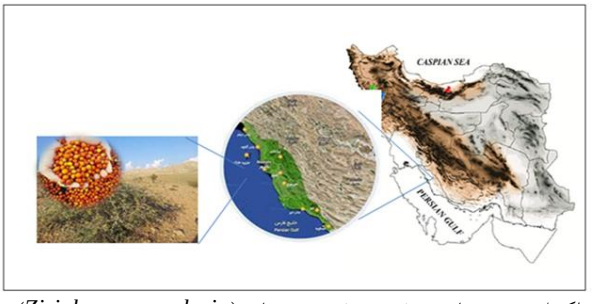
مواد شیمیایی، حلال‌ها، استانداردها و محیط‌های کشت مورد استفاده در مطالعه از شرکت مرک[8] آلمان و پودر شیر از شرکت مولتی ایران، تهیه گردیدند. سویه‌های باکتریایی مرجع شامل اشریشیا کلی (ATCC 25922)، سالمونلا تیفی (ATCC 1609)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)، باسیلوس سرئوس (ATCC 9634)، یک سویه مخمر کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) و یک سویه کپک آسپرژیلوس نایجر (ATCC 9142)، از آزمایشگاه میکروب‌شناسی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، نگهداری شده در محیط کشت اسکیم میلک حاوی ۱۰ درصد گلیسرول تهیه گردیدند.

نمونه‌برداری و آماده‌سازی اولیه

میزان ۳۰ کیلوگرم از میوه‌های رسیده و تازه رملک در آبان‌ماه سال ۱۳۹۸، از درختچه‌های وحشی رملک در جنگل‌های کوهپایه‌ای زاگرس واقع در منطقه پشت‌پر شهرستان دشتستان، پس از شناسایی دقیق گونه گیاهی توسط پژوهشگران مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان بوشهر، جمع‌آوری گردیدند (شکل ۱). پس از پاک‌سازی کامل نمونه، جداسازی و هسته‌گیری میوه‌های سالم، به مدت ۱۵ روز در دمای اتاق با

[8] Merck

بررسی مداوم خشک و سپس، توسط آسیاب به‌صورت پودر در آورده شدند. سپس نمونه‌ها، جهت انجام آنالیزهای مورد نظر، به آزمایشگاه آنالیز دستگاهی غذا و داروی بوشهر ارسال گردیدند. همچنین، بخشی از نمونه پس از آماده‌سازی‌های اولیه در این آزمایشگاه، به آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت ارزیابی میکروبی، ارسال گردیدند.



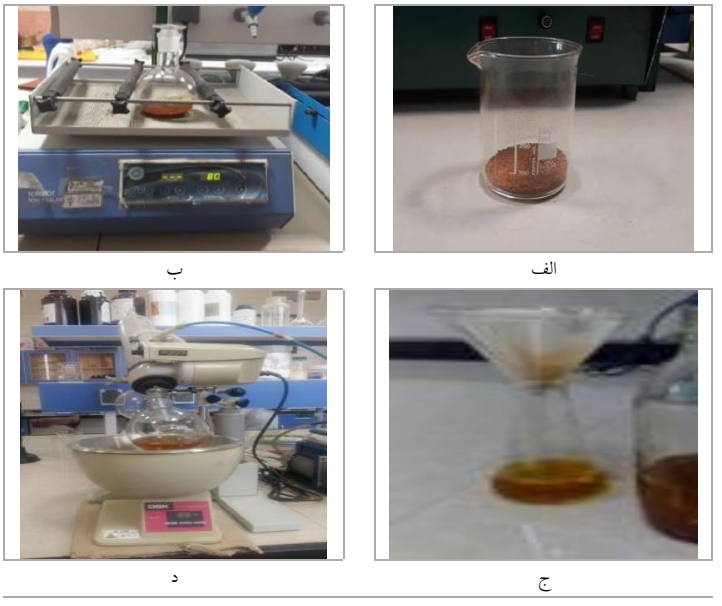
شکل ۱) منطقه نمونه‌برداری میوه رملک از درختچه‌های وحشی زیزیفوس موریتانی (*Ziziphus nummularia*)، واقع در جنگل کوهپایه‌های زاگرسی منطقه پشت‌پر شهرستان دشتستان، بوشهر- ایران

Fig 1) the Ziziphus fruit sampling area from the wild shrubs of *Ziziphus nummularia*, located in the forest of Zagros foothills, Poshtpar region, Dashtestan city, Bushehr, Iran.

آماده‌سازی نمونه جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی

به‌منظور تهیه عصاره آلی میوه رملک، مقدار ۱۵ گرم از پودر لیوفیلیزه میوه رملک با ۱۵ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های سه‌گانه متانول: کلروفرم: ان- هگزان (۱:۱:۱)، مخلوط و به‌مدت ۲۴ ساعت توسط روتاتور با دور ۸۰rpm، به‌هم زده شد. مخلوط حلال، پس از صاف نمودن با کاغذ صافی واتمن شماره یک، جهت رسوب ناخالصی‌ها، در دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه، سانتریفیوژ گردید. سپس، حلال‌ها توسط دستگاه تبخیرکننده[9] و نمونه به‌دست آمده تا زمان انجام آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (شکل ۲) (۱۹).

[9] Rotary Evaporator



شکل ۲) مراحل تهیه عصاره آلی از میوه رملک جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی با روش GC-MS. پودر میوه رملک (الف)؛ استخراج با حلال‌های سه‌گانه متانول:کلروفرم: n – هگزان (۱:۱:۱) (ب)؛ مرحله صاف نمودن نمونه (ج)، حذف حلال توسط دستگاه روتاری تبخیر در خلاء (د).

Fig 2) the preparation steps of the organic extract from the Ziziphus fruit to identify the chemical compositions by GC-MS method. The lyophilized Ziziphus fruit (a); Extraction with the triple solvents' methanol: chloroform: n – hexane (1: 1: 1) (b); the filteration stage of the sample (c); removing the solvent by the vacuum rotary evaporator (d).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آلی میوه رملک به‌روش DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره توسط DPPH، با استفاده از روش رنگ‌سنجی مورد سنجش گرفت. آزمون DPPH یکی از قدیمی‌ترین روش‌های سنجش غیرمستقیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که برای یافتن ترکیبات دهنده هیدروژن در مواد طبیعی پیشنهاد شده است و بر اساس واکنش رادیکال آزاد پایدار DPPH با ترکیبات دهنده هیدروژن مانند فنول‌ها استوار می‌باشد. این آزمون نسبتاً اختصاصی عمل می‌کند و بخصوص با ترکیباتی که حاوی گروه هیدروکسیل می‌باشند، واکنش می‌دهد. بدین منظور، یک میلی‌لیتر از محلول متانولی رملک با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با سه میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول مخلوط و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب محلول حاصل، با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتویی سیسیل[10] (سیسیل، انگلستان)، در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH)، با استفاده از رابطه ذیل محاسبه گردید. در محلول کنترل، به‌جای نمونه از حلال متانول استفاده گردید (۲۰). آسکوربیک اسید، به عنوان ماده مرجع بود.

$$\text{درصد مهار (٪)} = \frac{(\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل})}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

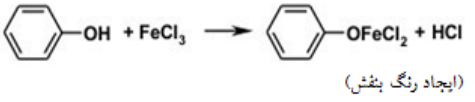
تعیین غلظت محتوای فنولی تام عصاره رملک

تعیین کیفی ترکیبات فنولی بر اساس روش الیا (Elya

[10] CECIL

و همکاران، انجام گرفت؛ به‌طور خلاصه، مقدار ۲۰ میلی‌گرم از عصاره به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به‌هم زده شد. سپس، دو قطره محلول یک درصد $FeCl_3$ افزوده شد؛ تشکیل رنگ بنفش، بیانگر وجود هسته فنلی در محلول بود (۲۱):

$$C_6H_5\text{-}OH + FeCl_3 \rightarrow C_6H_5\text{-}OFeCl_2 \text{ (رنگ بنفش)} + HCl$$



محتوای فنلی تام عصاره با روش فولین- سیوکالتو[11] تعیین گردید. در این روش، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول متانولی عصاره با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد (V/V) واکنش‌گر فولین- سیوکالتو اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۶ دقیقه در تاریکی به‌هم زده و سپس ۸۰ میکرولیتر از محلول ۷/۵ درصد سدیم کربنات به آن افزوده شد و پس از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. از محلول‌های با غلظت بین ۱ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر گالیک اسید، برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شدند و محتوای فنلی تام نمونه، بر حسب معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک، بدست آمدند (۲۲).

تعیین کیفی محتوای فلاونوئیدی عصاره

جهت غربالگری کیفی ترکیبات فلاونوئیدی، بر اساس روش آسایش (Asayesh) و همکاران، مقدار ۵۰ میلی‌گرم پودر لیوفیلیزه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل و صاف گردید. پس ازآن، ابتدا ۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاک رقیق (۵ درصد)، به ۱۰ میلی‌لیتر از آن افزوده و سپس مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه گردید. پیدایش رنگ زرد بیانگر وجود، ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه بود (۲۳).

تعیین ترکیبات شیمیایی (متابولیت‌های ثانویه) به‌روش کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی

جهت تعیین ترکیبات شیمیایی، یک میکرولیتر از عصاره آلی تهیه شده میوه رملک، پس از عبور از فیلتر سرسرنگی، به دستگاه GC-MS (Agilent 5977A-MS، GC-5890B) مجهز به آشکارساز جرمی و ستون کاپیلاری HP-5MS تزریق گردید. جهت برنامه دمایی، ابتدا آون دستگاه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه قرار داده شد. سپس دما با سرعت ۲۵ درجه در هر دقیقه به ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و پس از آن بلافاصله با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و سرانجام، با سرعت ۸ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید. زمان نهایی اجراء[12]، ۷۲/۶۷ دقیقه و دماهای اینجکتور، دتکتور و منبع یون به‌ترتیب بر ۲۴۰، ۲۵۰ و ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم بودند. از گاز هلیم با فلوی ۲۱/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و فشار ۴psi با نسبت ۱: ۳۰ به‌عنوان گاز حامل و از طیف‌سنج جرمی چهارقطبی با یونیزاسیون انرژی و حالت ۷۰eV استفاده گردید. دستگاه مجهز به نرم‌افزار کمستیشن[13] (USA، Agilent G1701DA GC/MSD ChemStation) بود. شناسایی ترکیبات براساس مقایسه طیف‌های جرمی موجود در کروماتوگرام عصاره میوه رملک با کتابخانه مؤسسه ملی استاندارد و تکنولوژی (NIST)[14] و وایلی (Wiley) انجام گردید. ساختار

[11] Folin–Ciocalteu method

[12] Run time
[13] Chemstation
[14] National Institute of Standards and Technology

ترکیبات با جستجو در بانک داده‌های پزشکی پابکم[15]، مورد تأیید قرار گرفت. فراوانی هر یک از ترکیبات در نمونه، از محاسبه سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام بر حسب درصد بدست آمدند (۱۹).

آماده‌سازی عصاره میوه رملک، جهت آزمون‌های میکروبی

برای تهیه عصاره رملک جهت آزمون‌های میکروبی، مقدار ۷۵۰ میلی‌گرم از پودر لیوفیلیزه، به ۶ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل افزوده و توسط ورتکس کاملاً مخلوط گردید. به‌منظور استریل نمودن عصاره، سوسپانسیون به‌دست آمده ابتدا از فیلتر سر سرنگی (جت‌بیوفیل[16]، چین)، با قطر ۰/۴۵ نانومتر و سپس از فیلتر سر سرنگی با قطر ۰/۲۲ نانومتر عبور داده شدند. برای اطمینان از استریل بودن عصاره، مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان)، به‌صورت خطی، کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. عدم رشد میکروارگانیسم، نشانگر استریل بودن عصاره بود (۲۴).

سویه‌های باکتریایی مورد بررسی و آماده‌سازی آن‌ها

جهت بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی میوه رملک از دو سویه باکتریایی گرم منفی مرجع شامل اشریشیا کلی (ATCC 25922) و سالمونلا تیفی (ATCC 1609)، دو سویه گرم مثبت استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و باسیلوس سرئوس (ATCC 9634) و یک سویه مخمر کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) و یک سویه کپک آسپرژیلوس نایجر (ATCC 9142)، موجود در آزمایشگاه میکروب‌شناسی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که برای نگهداری طولانی مدت، در محیط کشت اسکیم میلک حاوی ۱۰ درصد گلیسرول و دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره بودند استفاده گردید. جهت فعالسازی و دسترسی به کشت تازه از سویه‌های مورد بررسی، ۲۴ ساعت قبل از آزمون، هر سویه به‌طور مجزا با روش کشت خطی یا استریک پلیت، از محیط اسکیم میلک به محیط نوترینت آگار انتقال داده شدند (۲۴).

آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی

ابتدا، قبل از آزمون‌های ضدمیکروبی، سوسپانسیونی معادل با استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه گردید، در این حالت، استاندارد نیم مک‌فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون که برای سویه‌های باکتریایی $۱/۵\times۱۰^{۱۷}$ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر (CFU/ml) و برای سویه‌های قارچی ۳×۱۰^{۶} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر بود، ایجاد می‌کند. برای تأیید فعال بودن هر یک از سویه‌های موجود در سوسپانسیون میکروبی اولیه، رقت‌های متوالی ده برابر تهیه گردید. سرانجام، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، با بررسی کدورت محتوای لوله‌ها، رشد میکروارگانیسم‌ها در آن‌ها مشخص گردید (۲۴).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره میوه رملک

سوسپانسیون سویه‌های باکتریایی و قارچی مرجع در محیط مایع مولر هینتون 2X (مرک، آلمان) در مجاورت عصاره تهیه شده از میوه رملک قرار گرفتند. مقدار محتویات هر لوله، به نحوی تنظیم شد که حجم نهایی هر یک از لوله‌های تست، کنترل مثبت رشد

[15] PubChem
[16] Jet Biofil
[17] Colony Forming Units

(باکتری + محیط مایع مولر هینتون 2X) و کنترل منفی رشد (عصاره + محیط مایع مولر هینتون 2X)، یک میلی‌لیتر باشد. پس از افزودن ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسم به لوله‌های تست و کنترل مثبت رشد، غلظت نهایی باکتری‌ها و قارچ‌ها در هر لوله به‌ترتیب 5×10^5 و 1×10^4 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر بود. همه لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C، انکوبه شدند؛ سپس از لوله تست مربوط به هر میکروارگانیسم، ۶ رقت متوالی ۱۰ برابر تهیه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، میزان رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها براساس واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر، محاسبه گردید و با میزان رشد باکتری و قارچ در لوله کنترل فاقد عصاره مورد مقایسه قرار گرفت. حساسیت یا عدم حساسیت هر سویه به عصاره، با ایجاد کدورت محتوای لوله‌ها تعیین و با رقت‌های حاصل از سوسپانسیون اولیه آن سویه مقایسه گردید (۲۴).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی میوه رملک

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[18] و حداقل غلظت کشندگی (MBC)[19] عصاره بر روی سویه‌های حساس، با استفاده از روش رقت‌سازی در لوله (میکرودایلوشن[20]) انجام شد. در این روش، از چاهک ۹۶ خانه استریل و معرف تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلرید ۵ درصد، جهت بررسی رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده گردید. ابتدا، محلول پایه عصاره با غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت مولر هینتون براث و دی‌متیل سولفوکسید تهیه و با عبور از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. سپس، غلظت‌های مختلف عصاره (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با رقیق‌سازی محلول پایه با محیط کشت مولرهینتون براث تهیه گردیدند. جهت فعال‌سازی سویه‌های میکروبی، از محیط کشت مولر هینتون براث استفاده شد و کشت تازه آن‌ها ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، در محیط کشت نوترینت آگار تهیه گردید. پس از آن، به هریک از چاهک‌های ۹۶ خانه، ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده از عصاره میوه رملک و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروب مورد نظر (با غلظت معادل ۰/۵ مک‌فارلند) اضافه شد. یک خانه به‌عنوان کنترل مثبت (محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی) و یک خانه به‌عنوان کنترل منفی (محیط کشت و عصاره) در نظر گرفته شد. سپس، چاهک‌های ۹۶ خانه، درب‌گذاری و در دمای بهینه رشد میکروارگانیسم به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سرانجام، به هریک از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه، ۲۰ میکرولیتر معرف تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلرید ۵ درصد اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری گردیدند. اولین خانه‌ای که در آن تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی ایجاد نشد به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره میوه رملک یادداشت گردید. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره، از خانه‌های فاقد رنگ قرمز یا اراغوانی (از حداقل غلظت مهارکنندگی به غلظت‌های بالاتر)، ۱۰۰ میکرولیتر بر پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و گرمخانه‌گذاری گردید. کمترین غلظت فاقد رشد میکروارگانیسم، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی برای سویه میکروبی مورد آزمون، در نظر گرفته شد (۲۵)

[18] Minimum Inhibitory Concentration
[19] Minimum Bactericidal Concentration
[20] Micro Dilution

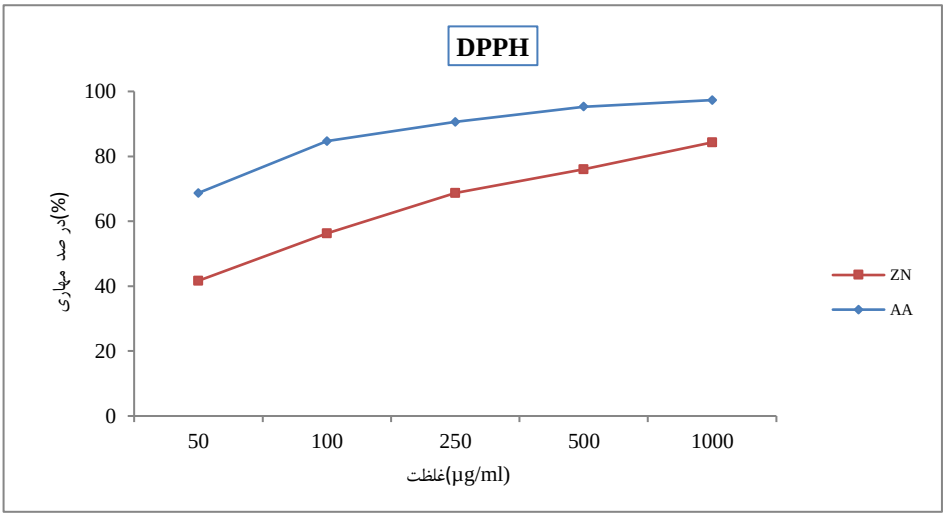
تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام گردیدند. نتایج با استفاده از آزمون آنالیز آماری واریانس مورد بررسی قرار گرفتند. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ و جهت رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد. به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کروسکال والیس در سطح معناداری آزمون ($p<۰/۰۵$)، استفاده شد. مدیریت دستگاه GC-MS توسط نرم‌افزار کمستیشن انجام گرفت.

یافته‌ها

مهار رادیکال‌های آزاد توسط DPPH

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره میوه رملک در برابر استاندارد آسکوربیک اسید در شکل (۳)، نشان داده شده است.



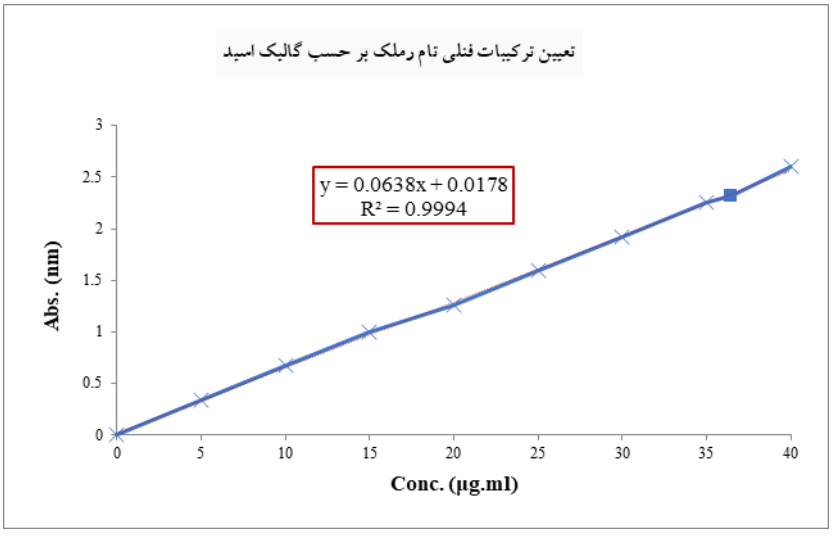
شکل ۳) ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه رملک و آسکوربیک اسید توسط روش DPPH.

Fig 3) Evaluation of antioxidant activities of the Ziziphus fruit extract and ascorbic acid by DPPH method.

بر اساس نتایج، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، شاخص IC_{50} برای آسکوربیک اسید و عصاره میوه رملک به‌ترتیب معادل ۳۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برآورد گردیدند. رابطه مستقیم غلظت و میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در شکل ۳ نشان داده شده است ($p<۰/۰۵$).

محتوای فنولی تام

در تعیین کیفی، تشکیل رنگ بنفش، بیانگر وجود هسته فنولی در عصاره میوه رملک بود. میزان ترکیبات فنولی تام موجود در عصاره، بر مبنای میزان جذب ناشی از واکنش ترکیبات فنولی محتمل در عصاره با معرف فولین- سیوکالتو و مقایسه آن با غلظت‌های مختلف گالیک اسید، برابر ۳۶/۴۵±۲/۰۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره خشک بدست آمد (شکل ۴) ($p<۰/۰۵$).



شکل ۴) منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، بعنوان استاندارد جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی تام عصاره میوه رملک.

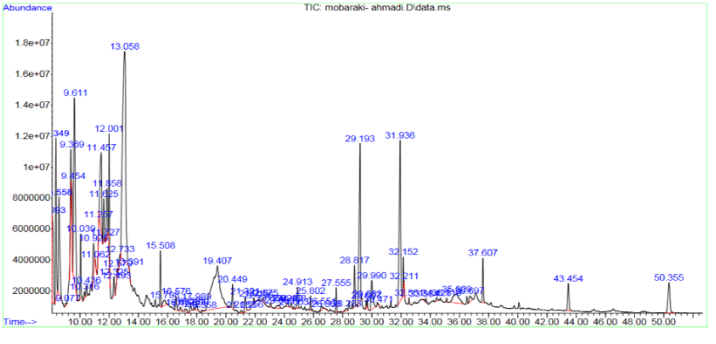
Fig 4) the calibration curve of the gallic acid as a standard, to measure of the total phenolic compounds of the Ziziphus fruit extract

تعیین کیفی محتوای فلاونوئیدی

در آزمون کیفی ترکیبات فلاونوئیدی عصاره آلی میوه رملک، حضور رنگ زرد بیانگر وجود فلاونوئیدها در نمونه بود که حضور ترکیبات فلاونوئیدی در آنالیز GC-MS نیز این نتیجه را تأیید نمود.

ترکیبات شیمیایی

آنالیز GC-MS عصاره متانول: کلروفرم: ان–هگزانی (۱:۱:۱) میوه رملک، حضور ۵۱ ترکیب شیمیایی مختلف با هسته‌ها و گروه‌های عاملی متنوع و ساختارهای شیمیایی مختلف را نشان داد. شکل ۵، یک کروماتوگرام مربوط به آنالیز GC-MS عصاره را نشان می‌دهد.



شکل ۵) طیفی از آنالیز GC-MS عصاره آلی میوه رملک

Fig 5) A spectum of the GC-MS analysis from the organic extract of the Ziziphus fruit.

پروفایل ترکیبات شیمیایی، همراه با فراوانی (٪) مربوط به هر یک از آن‌ها، در جدول ۱، آورده شده است.

جدول ۱) پروفایل ترکیبات شیمیایی حاصل از آنالیز **GC-MS** مربوط به عصاره متانول: کلروفرم: ان-هگزانی (۱:۱:۱) میوه رملک

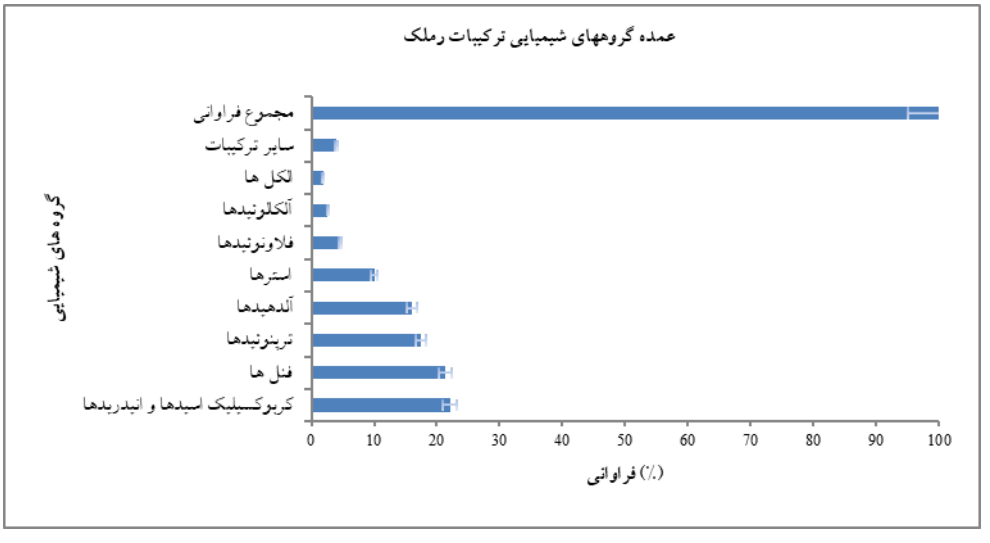
پیک	RT*	نام ترکیب	فرمول ملکولی	MW**	فراوانی (٪)
۱	۸/۰۹۳	2,5-Dimethylhexane	C_8H_{18}	۱۱۴/۲۳	۲/۹۵۴
۲	۸/۳۴۹	Furfural	$C_5H_4O_2$	۹۶/۰۸	۴/۲۹۹
۳	۸/۵۵۸	Maleic anhydride	$C_4H_2O_3$	۹۸/۰۶	۴/۱۰۱
۴	۹/۰۷۷	3-Hexadecyloxycarbonyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylimidazolium ion	$C_{24}H_{45}N_2O_3$	۴۰۹/۶	۰/۱۰۹
۵	۹/۳۶۹	Imidazole-4-carboxamide	$C_4H_5N_3O$	۱۱۱/۱	۱/۵۱۷
۶	۹/۴۵۴	3-Furoic acid	$C_5H_4O_3$	۱۱۲/۰۸	۰/۶۳۷
۷	۹/۶۱۱	2,7-Dimethyloctane	$C_{10}H_{22}$	۱۴۲/۲۸	۹/۷۹۷
۸	۱۰/۰۳۹	1-Octanol	$C_8H_{18}O$	۱۳۰/۲۳۱	۱/۴۸۵
۹	۱۰/۳۱۶	Methyl palmitoleate	$C_{17}H_{32}O_2$	۲۶۸/۴	۱/۳۷۴
۱۰	۱۰/۴۳۶	4-Oxononanoic acid	$C_9H_{16}O_3$	۱۷۲/۲۲	۰/۳۰۲
۱۱	۱۱/۰۶۲	6-Acetyl-beta-D-mannose	$C_8H_{14}O_7$	۲۲۲/۱۹	۰/۰۵۷
۱۲	۱۱/۲۵۷	Linamarin	$C_{10}H_{17}NO_6$	۲۴۷/۲۴	۰/۱۱۹
۱۳	۱۱/۴۵۷	Monomethyl fumarate	$C_5H_6O_4$	۱۳۰/۱	۴/۰۶۸
۱۴	۱۱/۶۲۵	2-Hexyl-4-acetoxytetrahydrofuran	$C_{12}H_{22}O_3$	۲۱۴/۳	۱/۱۴۷
۱۵	۱۱/۷۲۷	Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	۳۴۲/۳	۰/۰۴۴
۱۶	۱۱/۸۵۸	Dimethyl fumarate	$C_6H_8O_4$	۱۴۴/۱۲	۱/۵۸۴
۱۷	۱۲/۰۰۱	2,3,6,7-tetramethyloctane	$C_{12}H_{26}$	۱۷۰/۳۴	۲/۷۶۵
۱۸	۱۲/۳۲۵	Cystine acid	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	۲۴۰/۳	۰/۵۵۹
۱۹	۱۲/۴۹۳	Alyssin	$C_7H_{13}NOS_2$	۱۹۱/۳	۰/۰۸۵
۲۰	۱۲/۵۷۹	Trimethylolpropane	$C_6H_{14}O_3$	۱۳۴/۱۷	۰/۱۵۱
۲۱	۱۲/۷۳۳	Melezitose	$C_{18}H_{32}O_{16}$	۵۰۴/۴	۰/۵۴۸
۲۲	۱۳/۰۵۸	Pyrogallol	$C_6H_6O_3$	۱۲۶/۱۱	۲۱/۳۸۱
۲۳	۱۵/۵۰۸	2,3,4,5,6,7-hexamethyloctane	$C_{14}H_{30}$	۱۹۸/۳۹	۱/۲۹۴
۲۴	۱۵/۷۹۸	11-Octadecenal	$C_{18}H_{34}O$	۲۶۶/۴۷	۰/۴۷۴
۲۵	۱۶/۵۷۶	Methyl geranate	$C_{11}H_{18}O_2$	۱۸۲/۲۶	۰/۵۰۸
۲۶	۱۶/۸۸۷	Kainic acid	$C_{10}H_{15}NO_4$	۲۱۳/۲۳	۰/۱۶۱
۲۷	۱۷/۲۴۲	3-Hydroxylauric acid	$C_{12}H_{24}O_3$	۲۱۶/۳۲	۰/۲۱۹
۲۸	۱۷/۸۰۹	3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol	$C_{15}H_{32}O$	۲۲۸/۴۱	۰/۰۵۶
۲۹	۱۷/۹۸۹	1-Cyclopentyl-3-piperidinone	$C_{10}H_{17}NO$	۱۶۷/۲۵	۰/۳۵۳
۳۰	۱۹/۴۰۷	D-Allose	$C_6H_{12}O_6$	۱۸۰/۱۶	۱۰/۶۶۸
۳۱	۲۰/۴۴۹	3,3,4,5,6,8-Hexamethyldecane	$C_{16}H_{34}$	۲۲۶/۴۴	۰/۶۵۶
۳۲	۲۱/۳۲۱	4-Piperidinoaniline	$C_{11}H_{16}N_2$	۱۷۶/۲۶	۰/۵۹۷
۳۳	۲۱/۵۵۶	2-Myristynoyl pantetheine	$C_{25}H_{44}N_2O_5S$	۴۸۴/۷	۰/۰۰۷
۳۴	۲۱/۹۱۶	1-Nitro-beta-d-arabinofuranose, tetraacetate	$C_{13}H_{17}NO_{11}$	۳۶۳/۲۷	۰/۳۷۶
۳۵	۲۴/۴۸۸	Paromomycin	$C_{23}H_{45}N_5O_{14}$	۶۱۵/۶	۰/۵۰۶
۳۶	۲۴/۹۱۳	Myristic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	۲۲۸/۳۷	۰/۶۶۱
۳۷	۲۵/۸۰۲	Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	۳۸۰/۷	۰/۳۳۵
۳۸	۲۷/۵۵۵	Diisobutyl phthalate	$C_{16}H_{22}O_4$	۲۷۸/۳۴	۰/۵۹۳
۳۹	۲۸/۸۱۷	Palmitoleic acid	$C_{16}H_{30}O_2$	۲۵۴/۴۱	۱/۳۳۵
۴۰	۲۹/۱۹۳	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	۲۵۶/۴۳	۶/۳۵۹
۴۱	۲۹/۶۸۲	2-Hexadecanol	$C_{16}H_{34}O$	۲۴۲/۴۴	۰/۲۲۴

۴۲	۲۹/۹۹۰	17-Chloro-7-heptadecyne	$C_{17}H_{31}Cl$	۲۷۰/۹	۱/۵۳۲
۴۳	۳۱/۹۳۶	Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	۲۸۲/۵	۷/۰۱۰
۴۴	۳۲/۱۵۲	Stearic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	۲۸۴/۵	۰/۷۰۵
۴۵	۳۲/۲۱۱	Ethyl oleate	$C_{20}H_{38}O_2$	۳۱۰/۵	۰/۰۶۳
۴۶	۳۳/۵۸۴	Oleic acid, 3-(octadecyloxy)propyl ester	$C_{39}H_{76}O_3$	۵۹۳	۰/۱۱۷
۴۷	۳۴/۴۲۸	Ethyl cholate	$C_{26}H_{44}O_5$	۴۳۶/۶	۰/۵۲۳
۴۸	۳۵/۸۰۹	Strophanthidin-D-xylose	$C_{28}H_{40}O_{10}$	۵۳۶/۶	۱/۶۸۶
۴۹	۳۷/۶۰۷	Apocholic acid	$C_{24}H_{38}O_4$	۳۹۰/۶	۱/۲۴۰
۵۰	۴۳/۴۵۴	Cycloartanol	$C_{30}H_{52}O$	۴۲۸/۷	۱/۱۲۹
۵۱	۵۰/۳۵۵	17-Pentatriacontene	$C_{35}H_{70}$	۴۹۰/۹	۱/۸۴۷
				مجموع	۱۰۰

*RT (Retention time): زمان نگهداری برحسب دقیقه

**MW (Molecular weight): وزن مولکولی برحسب گرم بر مول

از عمده گروه‌های عاملی و شیمیایی در ۵۱ متابولیت ثانویه موجود در عصاره آلی میوه رملک را می‌توان به اسیدهای کربوکسیلیک، انیدریدها، ترکیبات فنولی و ترپنوئیدها، آلدهیدها، استرها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، الکل‌ها و سایر گروه‌ها اشاره نمود. بیشترین میزان فراوانی در این گروه‌ها به‌ترتیب مربوط به گروه اسیدهای کربوکسیلیک و انیدرید آن‌ها (۲۲/۰۴۹ درصد)، ترکیبات فنولیک (۲۱/۳۸۱ درصد)، مشتقات ترپنوئیدی (۱۷/۴۶۶ درصد)، آلدهیدها (۱۵/۹۸۹ درصد)، استرها (۱۰/۰۰۶ درصد)، مشتقات فلاونوئیدی (۴/۵۷۸ درصد)، سایر گروه‌ها (۴/۰۳۹ درصد)، آلکالوئیدها (۲/۵۷۶ درصد) و الکل‌ها (۱/۹۱۶ درصد) بودند (شکل ۶).



شکل ۶) فراوانی ترکیبات شناسایی شده توسط GC-MS از عصاره آلی میوه رملک.

Fig 6) the abundance of compounds detected by GC-MS from the organic extract of Ziziphus fruit.

ترکیبات غالب عصاره آلی میوه رملک، پیروگالول با فراوانی ۲۱/۳۸۱ درصد، از خانواده فنول‌ها و پس از

آن D-آلوز و ۲،۷-دی‌متیل اکتان به‌ترتیب با مقادیر ۱۰/۶۶۸ و ۴۹/۷۹۷ درصد بود. در آنالیز عصاره آلی میوه رملک، تعداد ۱۲ ترکیب از مشتقات ترپنوئیدی شامل ۲،۵-دی متیل‌هگزان (C_8H_{18})، ۲،۷- دی متیل‌اکتان ($C_{10}H_{22}$)، ۲،۳،۶،۷- تترا متیل‌اکتان ($C_{12}H_{26}$)، ۲،۳،۴،۵،۶،۷- هگزا متیل‌اکتان ($C_{14}H_{30}$)، ۳،۳،۴،۵،۶،۸- هگزا متیل‌دکان ($C_{16}H_{34}$)، متیل‌گرانات[۲۱] ($C_{11}H_{18}O_2$)، سیکلوآرتانول[۲۲] ($C_{30}H_{52}O$)، آپوکولیک‌اسید[۲۳] ($C_{24}H_{38}O_4$)، اتیل‌کولات ($C_{26}H_{44}O_5$)، استروفانتیدین -D- زایلوز ($C_{28}H_{40}O_{10}$)، ۱-سیکلوپنتیل-۳- پیپریدینون ($C_{10}H_{17}NO$) و ترکیب ایمیدازول-۴- کربوکسامید[۲۴] ($C_4H_5N_3O$)، شناسایی گردیدند. بیشترین فراوانی مربوط به ترکیب ۲،۷- دی متیل اکتان (۹/۷۹۷ درصد)، بود. در مطالعه حاضر، تعداد یازده اسید چرب یا مشتقات آن‌ها شامل ۳- فوروئیک اسید[۲۵] ($C_5H_4O_3$) (یک آنالوگ ساختاری نیکوتینیک اسید (نیاسین)، میریستیک‌اسید ($C_{14}H_{28}O_2$)، پالمیتیک اسید ($C_{16}H_{32}O_2$)، اولئیک‌اسید ($C_{18}H_{34}O_2$)، استئاریک اسید ($C_{18}H_{36}O_2$)، پالمیتولئیک اسید ($C_{16}H_{30}O_2$)، ۳- هیدروکسی لوریک‌اسید ($C_{12}H_{24}O_3$)، سیستین اسید ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$)، کاینیک‌اسید[۲۶] ($C_{10}H_{15}NO_4$)، ۴- اُکسونونانوئیک اسید[۲۷] ($C_9H_{16}O_3$) و مونومتیل‌فومارات ($C_5H_6O_4$) و ترکیب انیدریدی مالئیک انیدرید با فرمول شیمیایی ($C_4H_2O_3$) و مجموع فراوانی ۲۶/۱۱۷ درصد شناسایی شدند که از این میان، به‌ترتیب اولئیک اسید (۷/۰۱۰ درصد) و پالمیتیک‌اسید (۶/۳۵۹ درصد)، دارای بیشترین فراوانی بودند.

علاوه براین، تعداد یازده ترکیب استر کربوکسیلیک اسید شامل مونومتیل فومارات ($C_5H_6O_4$)، دی‌ایزوبوتیل فتالات ($C_{16}H_{22}O_4$)، دی‌متیل‌فومارات ($C_6H_8O_4$)، ۱- نیترو- بتا- D-آرابینوفورانوزتترا استات[۲۸] ($C_{13}H_{17}NO_{11}$)، متیل‌پالمیتولئات ($C_{17}H_{32}O_2$)، ۶- استیل- بتا-D- مانوز ($C_8H_{14}O_7$)، لیناماریـن[۲۹] ($C_{10}H_{17}NO_6$)، اتیل اولئات ($C_{20}H_{38}O_2$)، متیل‌گرانات ($C_{11}H_{18}O_2$)، اولئیک اسید، ۳-(اکتادسایلیوکسی) پروپیل‌استر[۳۰] ($C_{39}H_{76}O_3$) و ۲- هگزیل-۴-استوکسی تتراهیدروفوران ($C_{12}H_{22}O_3$)، با مجموع فراوانی ۱۰/۰۰۶ درصد، نیز در مطالعه اخیر شناسایی شدند و متابولیت‌های مونومتیل‌فومارات و دی‌متیل فومارات به‌ترتیب با میزان ۴/۰۶۸ و ۱/۵۸۴ درصد بیشترین مقدار از این استرها را شامل شدند.

فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره و حداقل غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی آن‌ها

نتایج ارزیابی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره میوه رملک بر روی سویه‌های باکتری‌های گرم منفی اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی، باکتری‌های گرم‌مثبت باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس-اورئوس و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر (کپک) و کاندیدا آلبیکنس (مخمر)، همچنین، مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن‌ها به‌روش میکرودایلوشن در

[21]Methyl geranate
[22]Cycloartanol
[23]Apocholic acid
[24]Imidazole-4-carboxamide
[25]3-Furoic acid
[26]Kainic acid
[27]4-Oxononanoic acid

[28]1-Nitro-beta-D-arabinofuranose, tetraacetate
[29]Linamarin
[30]Oleic acid, 3-(octadecyloxy)propyl ester

جدول ۲ آمده است. از آنجا که در آزمون غربالگری، میکروارگانیسمی که در غلظت بالاتر عصاره رشد نماید حساسیت کمتری به ماده ضدمیکروبی دارد، براساس نتایج، عصاره آبی میوه رملک، دارای سطوح متفاوتی از فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها بود؛ بطوری‌که باکتری‌های گرم منفی بالاترین مقاومت را از خود نشان دادند و حساس‌ترین سویه در برابر این عصاره، کاندیدا آلبیکنس بود. نتایج، بیانگر کمترین میزان از شاخص‌های MIC و MBC، برای سویه‌های قارچی به‌خصوص مخمر کاندیدا آلبیکنس و در نتیجه بیشترین میزان تأثیر این عصاره بر آن‌ها، و نیز بالاترین میزان از این شاخص‌ها، برای باکتری‌های گرم منفی و در نتیجه کم‌ترین میزان تأثیر عصاره مذکور بر آن‌ها بود. در مجموع، میزان فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی میوه رملک بر روی سویه‌های قارچی آسپرژیلوس نایجر و به‌ویژه مخمر کاندیدا آلبیکنس بیشتر بود.

جدول ۲) نتایج غربالگری حساسیت ضدمیکروبی عصاره میوه رملک در رقت‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها و حداقل غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی آن‌ها به روش میکرودایلوشن

میکروارگانیسم	رقت						MIC	MBC
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	(mg/ml)	
اشریشیا کلی	–	+	+	+	+	+	۱۶	۵۱۲<
سالمونلا تیفی	–	+	+	+	+	+	۱۶	۵۱۲<
باسیلوس سرئوس	–	–	+	+	+	+	۸	۵۱۲
استافیلوکوکوس اورئوس	–	–	+	+	+	+	۸	۵۱۲
آسپرژیلوس نایجر	–	–	–	–	+	+	۴	۱۶
کاندیدا آلبیکنس	–	–	–	–	–	+	۴	۸

+ : رشد؛ – : عدم رشد؛ MIC : حداقل غلظت مهارکنندگی؛ MBC : حداقل غلظت کشندگی

بحث

ترکیبات استخراج شده از منابع گیاهی، دارای فعالیت‌های زیستی و اثرات فارماکولوژیکی مفید متعددی می‌باشند (۲۶). ترکیبات شیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌ها دو دسته عمده از غذا–داروها هستند (۲۷). اثرات آنتی اکسیدانی میوه کنار به‌واسطه داشتن ترکیبات زیست‌فعال، کاملاً مشخص گردیده است (۲۸).

استرس اکسیداتیو یکی از شناخته شده‌ترین علل بسیاری از بیماری‌های مزمن است که توسط رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌گردد. مهم‌ترین عامل دفاعی علیه رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها هستند (۲۹). از آنجا که آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها نظیر دیابت، پیری، التهاب، سرطان، آترواسکلروز، صدمات کبدی، آلزایمر، پارکینسون و بیماری‌های عروق کرونر قلب مؤثر می‌باشند (۳۰)، یافتن گیاهانی با اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی می‌تواند در کاهش سیر این بیماری‌ها مؤثر و یکی از مهم‌ترین عوامل مقابله با افزایش فاکتورهای التهابی و بروز التهاب در بدن باشند. در مطالعات مختلف، اثرات محافظتی میوه تیره عنابیان در کبد بیان شده است که این اثرات را به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن نسبت می‌دهند (۳۱). نشان داده شده است که میوه این گیاهان می‌تواند از طریق مهار بیان نیتریک‌اکسید در کاهش التهاب حاد و مزمن مؤثر باشد (۳۲ و ۳۳).

با توجه به فواید ارزشمند درمانی و زیست‌پزشکی این گونه گیاهی و از طرفی وجود فراوان درختچه‌های وحشی رملک در جنگل‌های کوهپایه‌ای زاگرس واقع در منطقه پشت‌پر شهرستان دشتستان، در بخشی از مطالعه اخیر، قدرت آنتی اکسیدانی عصاره آلی میوه رملک، با استفاده از روش DPPH و تعیین محتواهای فلاونوئیدی و فنولی تام، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مطالعه حاضر، شاخص IC_{50} برای عصاره مذکور و آسکوربیک اسید به‌عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان استاندارد، به ترتیب معادل ۷۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. در مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه زیزیفوس اسپیناکریستی[31] با روش DPPH توسط سینگ (Singh) و همکاران، میزان IC_{50} برابر با ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۴) و در مطالعه سترکی (Setorki) و همکاران، میزان IC_{50} عصاره هیدروالکلی برگ زیزیفوس اسپیناکریستی، معادل ۷۵/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمدند (۳۵). بنابراین، میوه رملک با توجه به ظرفیت ضداکسایشی قابل ملاحظه خود، می‌تواند به‌عنوان یک منبع بالقوه آنتی‌اکسیدانی طبیعی در نظر گرفته شود.

در مطالعه حاضر، با افزایش غلظت عصاره، میزان فعالیت مهاری آنتی‌اکسیدانی نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت؛ این نتیجه با نتایج مطالعات آلوتمن (Alothman) و همکاران، شوکلا (Shukla) و همکاران و همچنین، سان (Sun) و همکاران، مطابقت داشت (۳۸-۳۶). بر اساس یافته‌های سانچز- مورنو (Sanchez-Moreno) و همکاران، اثر افزایش غلظت بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره، گواه بر همبستگی بین میزان ترکیبات فنولی عصاره و قدرت احیاءکنندگی آن دارد که با افزایش غلظت عصاره، مقدار ترکیبات فنولی نیز افزایش یافته و در نتیجه به دلیل افزایش در تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، قدرت مهارکنندگی عصاره به دلیل افزایش احتمال هیدروژن‌دهی به رادیکال‌های آزاد، افزایش می‌یابد (۳۹). بنابراین، می‌توان بیان نمود که ترکیبات دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه رملک و اثر سینرژیستی این ترکیبات، نقش مهمی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن دارند (۴۰).

در بین ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری محسوب می‌شوند. فلاونوئیدها بازدارنده‌های قوی رادیکال‌های آزاد هستند که به‌طور مستقیم موجب مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیل می‌گردند. گیاهان حاوی ترکیب‌های فلاونوییدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را از خود نشان می‌دهند (۴۱).

حضور ترکیبات فلاونوئیدی در غربالگری کیفی، تأئیدی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بود. در مطالعات مختلف، مقادیر متفاوتی از محتوای فنولی و فلاونوئیدی میوه رملک گزارش گردیده‌اند؛ براساس مطالعه امان (Aman) و همکاران، محتوای فنولی در عصاره متانولی- آبی، میوه رملک، ۵۸۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه بود (۴۲). در یک مطالعه مشابه، بر روی یازده ژنوتیپ زیزیفوس در استان هرمزگان، مشخص گردید که ژنوتیپ‌های رملک و کنار دارای بیشترین محتوای فلاونوئیدی می‌باشند (۴۳). به‌علاوه، نتایج مطالعه چیتی (Chiti) و همکاران، نشان داد که محتواهای فنولی کل، فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی در دو اکوتیپ بیرجند و خواف از گونه زیزیفوس دارای تفاوت معنی‌داری هستند (۴۴). تفاوت در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولی گیاهان در

[31] *Ziziphus spina-christi*

مطالعات مختلف، می‌تواند مربوط به عوامل متعددی چون شرایط اقلیمی، خاک، زمان جمع‌آوری نمونه، روش‌های خشک کردن، استحصال و نیز تفاوت در روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد (۲۴). در ارزیابی محتوای فنولی تام عصاره‌های مختلف دی‌کلرومتانی، متانولی، اتری و استونی میوه رملک، گوپتا (Gupta) و همکاران، نشان دادند که در بین عصاره‌ها، قوی‌ترین اثر مربوط به عصاره دی کلرومتانی با مقدار ۳۳/۹۴±۰/۲ میکرواکی‌والان گرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم عصاره خشک است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی حداکثری نیز بود (۴۵)؛ همچنین، یافته‌های آلوتمن (Alothman) و همکاران، نیز نشان داد که نوع حلال استخراجی، تأثیر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فنولی دارد. آن‌ها تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را با اختلاف در قطبیت حلال‌های مورد استفاده مرتبط دانستند و نشان دادند که حلال‌های قطبی، توانایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارند (۳۶). با توجه به غنا و تعدد ترکیبات ضداکسایشی میوه رملک جمع‌آوری شده از کوهپایه‌های استان بوشهر و نقش غذا- دارویی این ترکیبات، امید است بتوان با تکثیر بر اساس اصول کشاورزی و استفاده بهینه از میوه رملک در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها گام مؤثری برداشت.

متابولیت‌های ثانویه گیاهی جزو گرانبهاترین ترکیبات شیمیایی می‌باشند (۴۶). درخت کنار (Ziziphus)، دارای اهمیت دارویی فراوانی در تولید ترکیبات مؤثره و متابولیت‌های ثانویه منحصربه‌فرد است و تقریباً همه بخش‌های آن برای اهداف دارویی استفاده می‌شود. از خصوصیات دارویی عصاره، می‌توان به اثرات ضدالتهابی، ضدباکتریایی، التیام بیماری‌های پوستی، درمان پرادراری، تب و بی‌خوابی اشاره نمود (۴۷).

در مطالعه اخیر، از عصاره آلی میوه رملک، تعداد ۵۱ ترکیب شیمیایی شناسایی گردید. این ترکیبات، به گروه‌های شیمیایی و عاملی مختلفی از جمله اسیدهای کربوکسیلیک و انیدرید آن‌ها، فنول‌ها، مشتقات ترپنوئیدی، آلدهیدها، استرها، مشتقات فلاونوئیدی، آلکالوئیدها و الکل‌ها تعلق داشتند. مطابق بررسی‌های انجام شده در متون مختلف، این ترکیبات دارای اثرات بیولوژیکی و خواص نوتریسیتیکالی فراوانی می‌باشند. براساس مطالعات پیشین، تعداد ۴۸ ترکیب از ۵۱ ترکیب موجود، علاوه بر اثرات زیست‌پزشکی سودمند دیگر، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای بودند که بخشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه رملک را می‌توان به آن‌ها نسبت داد.

از ترکیبات عمده حاصل از آنالیز عصاره آلی میوه رملک، ترکیب فنولیک پیروگالول، با فراوانی ۲۱/۳۸۱ درصد بود. اثرات ضدباکتریایی پیروگالول در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی این ترکیب (۹۲/۷۷ درصد، در ۵۰۰ میکرومول) در مطالعه سینتیا (Cynthia) و همکاران، گزارش گردید (۴۸) که با نتایج مطالعه اخیر مبنی بر اثرات ضدباکتریایی عصاره میوه رملک در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و نیز فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه مشابهت داشت. حضور این ترکیب در عصاره میوه رملک در مطالعه حاضر می‌تواند یکی از علل فعالیت ضدباکتریایی رملک باشد. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های ضدباکتریایی آن پیشنهاد می‌شود به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد مطالعه قرار گیرد. علاوه براین، برخی اثرات زیستی دیگر پیروگالول نظیر اثرات مهاری آن بر

رشد سلول‌های آدنوکارسینومای ریوی انسان Calu-6 از طریق آپوپتوز وابسته به کاسپاز (۴۹)، اثرات ضدتکثیر پیروگالول نسبت به برخی رده‌های سلولی تومور انسانی (۵۰)، اثرات سیتوتوکسیسیتی پیروگالول بر سلول‌های مزانژیال (۵۱)، سلول‌های لنفوم انسانی (۵۲)، سلول‌های گلیومای انسانی (۵۳) و سلول‌های As4.1 ژاکتاگلومرولی[۳۲] (۵۴) به‌واسطه $O^{2\cdot-}$، اثرات آنتی‌استیل‌کولین‌استرازی این ترکیب (۵۵)، در منابع ذکر شده‌اند. محتمل است که باتوجه به حضور قابل ملاحظه پیروگالول در ماتریکس عصاره رملک، بتوان از این اثرات زیستی بهره جست.

چهار ترکیب فلاونوئیدی شامل سیکلوآرتانول[۳۳]، آپوکولیک‌اسید[۳۴] اتیل‌کولات[۳۵] و استروفانتیدین -D- زایلوز[۳۶]، در عصاره آلی میوه رملک، شناسایی گردیدند. از این میان، ترکیب استروفانتیدین -D- زایلوز دارای بیشترین فراوانی (۱/۶۸۶ درصد) بود. فلاونوئیدها علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع و مرتبط با جنبه‌های سلامتی از جمله فعالیت‌های ضدالتهابی، ضددیابتی، ضدسمیت، ضدویروسی، ضدسرطانی و ترمیم‌کنندگی زخم می‌باشند (۵۶). همچون مطالعه اخیر، لامین–مدا (Lamien-Meda) و همکاران، در مطالعه خود گزارش نمودند که میوه‌های جنس زیزیفوس طیف وسیعی از فلاونوئیدها را ارائه می‌دهند که با کاهش خطر ابتلا به سرطان و بیماری‌های قلبی- عروقی، نقش محافظتی خود را ایفاء می‌نمایند (۵۷).

یکی دیگر از متابولیت‌های گیاهی ترپنوئیدها و ایزوترپنوئیدها هستند. ترپنوئیدها، یک گروه عمده و مهم از ترکیبات طبیعی با ساختارهای متنوع هستند که به‌طور گسترده به‌عنوان مواد اولیه در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵۸). در آنالیز عصاره آلی میوه رملک در مطالعه حاضر، تعداد ۱۲ ترکیب از مشتقات ترپنوئیدی شناسایی گردیدند. بیشترین فراوانی مربوط به ترکیب ۲،۷–دی متیل اکتان بود. مطالعات متعدد در مورد ترپنوئیدها، نشان داده‌اند که آن‌ها دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و درمانی مختلفی همچون ضدتوموری، ضدالتهابی، ضدباکتری، ضدویروسی، ضدقارچی، ضدمالاریا، تقویت کنندگی پوست، پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی- عروقی، کاهندگی قندخون و بسیاری اثرات مفید دیگر هستند. علاوه‌بر این، برخی از ترپنوئیدها دارای فعالیت‌های حشره‌کشی، تعدیل کنندگی سیستم ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، ضدآلرژی، ضدپیری و محافظت از نور می‌باشند. بنابراین، مطالعه در مورد فعالیت بیولوژیکی ترپنوئیدها به کشف داروها و بهبود روش‌های درمانی کمک می‌کند (۵۹).

در مطالعه اخیر، چهار ترکیب آلدئیدی شامل فورفورال، D–آلوز، ۱۱– اُکتادِکنال و ملزیتوز با مجموع فراوانی ۱۵/۹۸۹ درصد شناسایی شدند. ترکیب D–آلوز، پس از پیروگالول، دارای بیشترین فراوانی (۱۰/۶۶۸ درصد) بود. دی‌آلوز یک مونوساکارید نادر از خانواده آلدوهگزوزها است که در طبیعت به‌ندرت یافت می‌شود و تاکنون فقط در چند گونه از جلبک‌های آب شیرین و بوته‌های گیاه آفریقایی پروتئا روبروپیلوسا[۳۷] شناسایی شده است (۵۶). نقش آنتی‌اکسیدانی D- آلوز و کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در میتوکندری سلول‌های عصبی، در مطالعه ایشیهارا (Ishihara) و همکاران، نشان داده شده است

[32] As4.1 juxtaglomerular cell
[33] Cycloartanol
[34] Apocholic acid
[35] Ethyl cholate
[36] Strophanthidin-D-xylose
[37] *Protea rubropilosa*

(۶۰). در یک مطالعه مشابه، کوشواها (Kushwaha) و همکاران، در ارزیابی فیتوشیمیایی عصاره متانولی میوه کنار آفریقایی زیزیفوس موریتانیایی توسط GC-MS، فراوانی قند دی‌آلوز را ۶/۹۲ درصد گزارش کردند و نشان داده شد که این قند دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از جمله اثرات ضدسرطانی، اثرات محافظتی در برابر ایسکمی قلبی، سرکوب کنندگی سیستم ایمنی در پیوند کبد ارتوتوپیک آلوژنیک و اثرات محافظت عصبی در برابر ایسکمی شبکیه می‌باشد (۶۱). همچنین از فعالیت‌های بیولوژیکی این ترکیب می‌توان به جلوگیری از پیشرفت استرس اکسیداتیو، التهاب و نکروز پوستی از طریق مهار بیان MKP-1 (۶۲)، عملکرد محافظتی بر صدمات کبدی حیوانات آزمایشگاهی (۶۳)، اثر مهاری بالقوه بر سرطان کبد موش‌های آزمایشگاهی (۶۴)، مهار رشد چندین نوع بدخیمی از جمله سرطان‌های هپاتوسلولار، پروستات، تخمدان، خون و سرطان ریه، به ویژه برای کارسینوم سلول سنگفرشی اشاره نمود (۶۵). با توجه به فراوانی قابل قبول دی‌آلوز در عصاره آلی میوه رملک و از طرفی فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع از جمله اثرات ضدسرطانی گسترده آن، می‌توان امیدوار بود که با استفاده از این بسته کامل غذا- دارویی از اثرات بسیار ارزشمند آن نیز بهره برد. در مطالعه حاضر، تعداد یازده اسید چرب یا مشتقات آن‌ها شناسایی شدند که از این میان، به‌ترتیب اولئیک اسید (۷/۰۱۰ درصد) و پالمیتیک‌اسید (۶/۳۵۹ درصد)، دارای بیشترین فراوانی بودند. در مطالعه مریم (Meriem) و همکاران، بر روی بررسی پروفایل اسیدهای چرب چهار اکوتیپ زیزیفوس شامل مهدیه[۳۸]، ماهرس[۳۹]، کوترانا[۴۰] و اسفکس[۴۱] توسط GC، نشان داده شد که اسید چرب عمده در اکوتیپ‌های اسفکس، مهدیه و ماهرس، ترکیب اولئیک اسید، به‌ترتیب با مقادیر ۴۶/۵۵، ۴۶/۶ و ۴۵/۴۷ درصد و در اکوتایپ کوترانا، با مقدار ۴۳/۵۵ درصد، دومین اسید چرب غالب، پس از پالمیتیک اسید می‌باشد (۶۶). در مطالعه گونچاروا (Goncharova) و همکاران، نیز اولئیک اسید با میزان ۲۴/۹ درصد بالاترین اسیدچرب زیزیفوس بود (۶۷). این نتایج شباهت زیادی با نتایج دو مطالعه ژائو (Zhao) و همکاران (۶۸)، و پنگ (Peng) و همکاران (۶۹) داشت که اولئیک اسید به‌عنوان ترکیب اصلی زیزیفوس معرفی گردیدند. اولئیک اسید یک اسید چرب امگا-۹ با اثرات تغذیه‌ای و پزشکی فراوان است که نقش آن در درمان برخی سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی- عروقی، خودایمنی، پارکینسون، آلزایمر، بیماری‌های التهابی، فشارخون بالا و بیماری سپسیس یا عفونت خونی حاد مشخص گردیده‌است (۷۰).

علاوه براین، تعداد یازده ترکیب استر کربوکسیلیک - اسید نیز در مطالعه اخیر شناسایی شدند و متابولیت‌های مونومتیل فومارات و دی‌متیل فومارات به‌ترتیب با میزان ۴/۰۶۸ و ۱/۵۸۴ درصد بیشترین مقدار از این استرها را شامل شدند. استرهای فوماریک اسید (FAE)، مولکول‌های کوچکی با اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و تنظیم کنندگی سیستم ایمنی بدن هستند. تأثیر درمانی بالقوه این استرها و قابلیت فراهمی زیستی قوی آن‌ها موجب شده است که داروهایی چون دی متیل فومارات (DMF) و مونومتیل فومارات (MMF)، در دسترس باشند (۷۱). دی متیل فومارات و مونومتیل فومارات دارای پتانسیل درمانی در آسیب ایسکمی مغز- خونرسانی مجدد

[38] Mahdia
[39] Mahres
[40] Choutrana
[41] Sfax

مغزی هستند و نقش محافظتی آن‌ها احتمالاً به‌عنوان واسط در مسیر Nrf2 می‌باشد (۷۲). بر اساس مطالعه کوراکیس (Kourakis) و همکاران، دی متیل فومارات رشد تومور و متاستاز را مهار و حساسیت سلول‌های CTCL را نسبت به آپوپتوز بازیابی می‌نماید و به دلیل سمیت ذاتی کم و خصوصیات ایمنی مطلوب، می‌تواند یک کاندید خوب در درمان بیماری CTCL باشد (۷۰). همچنین در مطالعه یائو (Yao) و همکاران، نشان داده شد که دی متیل فومارات در مدل بیماری پارکینسون، موجب بهبود مسمومیت عصبی دوپامینرژیک می‌شود (۷۲). استرهای فوماریک اسید می‌توانند اثرات مفیدی بر بیماری‌های میتوکندریایی همچون آتاکسی فریدریش[۴۲] و سایر اختلالات عملکرد میتوکندری، بیماری‌های مرتبط با تنفس از جمله کرونا ویروس جدید (COVID-19) در بیماران به ابتلای شدید سندرم طوفان سیتوکین[۴۳]، داشته باشند. پسوریازیس و ام–اس یک اتیولوژی واسطه ایمنی دارند که ناشی از التهاب شدید و استرس اکسیداتیو است. دی‌متیل فومارات و مونومتیل فومارات، به‌عنوان داروی پسوریازیس و ام–اس، مورد تأیید قرار گرفته‌اند. یک مخلوط فوماریک اسید متشکل از ۶۰ درصد دی‌متیل فومارات، برای درمان اشکال متوسط و شدید پسوریازیس با نام تجاری فومادرم[۴۴] تأیید گردیده‌است. داروی اسکیلارنس[۴۵] که منحصراً یک فرمولاسیون دی‌متیل فومارات است نیز توسط آژانس دارویی اروپا مورد تأیید قرار گرفته‌است (۷۰). گیل (Gill) و همکاران، دی‌متیل‌فومارات را به‌عنوان یک داروی کمکی در افراد مبتلا به HIV برای بهبود عوارض و مرگ ومیر، با بهبود فعالیت سیستم ایمنی بدن و مشکلات عفونی مرتبط، استرس اکسیداتیو سیستمیک و بیماری‌های همراه با HIV، پیشنهاد کردند (۷۳). حضور این ترکیبات کمیاب و مؤثر با خواص درمانی کم‌نظیر در کنار استفاده آن با اهداف تغذیه‌ای و یا جداسازی این ترکیبات از ماتریکس نمونه، می‌تواند اثرات غذا– دارویی خود را به مصرف کننده القاء نماید.

ترکیب بنزیمیدازول از گروه آلکالوئیدها از جمله ترکیبات عصاره آلی میوه رملک بود بنزیمیدازول‌ها به سهولت می‌توانند با بیوپلیمرهای سیستم‌های زنده که مسئول بسیاری از فعالیت‌ها و عملکردهای بیولوژیکی آن‌ها هستند، پیوند برقرار نمایند. مطالعه تزانی (Tzani) و همکاران، فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدسرطانی، مسکن، ضدالتهابی، ضدفشارخون و آنتی‌اکسیدانی را برای مشتقات بنزیمیدازول نشان دادند. آن‌ها به عنوان مهارکننده‌های پمپ پروتون، تعدیل کننده‌های سطح و داروهای ضددیابت شناخته شده‌اند (۷۴). مشتقات بنزیمیدازولی در مطالعه محمود (Mohamod) و همکاران، فعالیت ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای را در برابر چهار سویه باکتریایی اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند (۷۵). این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر در خصوص وجود ترکیبات بنزیمیدازول در عصاره آلی میوه رملک و خاصیت ضدباکتریایی عصاره این میوه بر برخی باکتری‌ها از جمله اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مشابهت داشت. حضور این ترکیب در ماتریکس عصاره مطالعه حاضر، ممکن است یکی از علل فعالیت‌های ضدمیکروبی رملک بر شش سویه بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی باشد.

براساس نتایج مطالعه حاضر، عصاره آبی میوه رملک

42 Ataxi Friedreichs
43 Cytokine Storm Syndrome
44 Fumaderm
45 Skilarence

دارای فعالیت‌های مهارکنندگی و کشندگی قابل ملاحظه‌ای در برابر هر شش سویه مورد بررسی بود و به‌خوبی قادر به مهار رشد آن‌ها بر سطح محیط کشت گردید. حداقل غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی این عصاره برای باکتری‌های گرم منفی، بیش از باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها بود؛ کمترین غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی به‌روش میکرودایلوشن برای مخمر کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان حساس‌ترین سویه به عصاره آبی میوه رملک، به‌ترتیب ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری گرم منفی مورد آزمون به‌ترتیب ۱۶ و بیش از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بر اساس نتایج، بیشترین میزان تأثیر عصاره بر مخمر کاندیدا آلبیکنس و کم‌ترین میزان تأثیر بر باکتری‌های گرم منفی بود.

در مطالعه امان (Aman) و همکاران، فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی- آبی (۲۰:۸۰) میوه رملک در برابر باکتری‌های گرم مثبت به‌ویژه استرپتوکوکوس‌پیوژنز، کورینه باکتریوم دیفتریا، استافیلوکوکوس‌اورئوس و استافیلوکوکوس- ساپروفیتیکوس به‌مراتب بیش از باکتری‌های گرم منفی بود. همچنین، شاخص حداقل غلظت‌مهارکنندگی برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به‌ترتیب ۳۱/۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۴۲). این نتایج از نظر تاثیر بیشتر عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی، با مطالعه اخیر، دارای مشابهت بود؛ میزان پایین‌تر شاخص MIC در مطالعه حاضر برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی، نشان دهنده تأثیر بیشتر عصاره آبی میوه رملک مطالعه حاضر بر رشد این باکتری‌هاست. در مطالعه بیگ (Beg) و همکاران، بر روی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های کلروفرمی، متانولی، هگزانی و همچنین عصاره‌های آبی میوه، برگ و پوست درخت رملک در مقابل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی، بیشترین فعالیت، مربوط به عصاره متانولی میوه رملک بود که با نتایج مطالعه اخیر در قدرت بازدارندگی عصاره آبی میوه رملک بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی مطابقت داشت (۷۶). همچنین، پادالیا و چاندا (Padalia & Chanda)، در بررسی تاثیر عصاره برگ رملک بر روی خاصیت ضدقارچی، نشان دادند که شاخص MIC برای کاندیدا آلبیکنس به میزان بسیار پایین و برابر ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است؛ این موضوع، نشان‌دهنده فعالیت بالای آنتی‌بیوتیکی، نسبت به آمفوتریسین B بود که از نظر قدرت شاخص MIC (چهار میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در مطالعه اخیر برای مخمر کاندیدا آلبیکنس همسو بود (۷۷). در مطالعه کومار (Kumar) و همکاران، نشان داده شدکه میوه رملک به‌علت محتوای ترکیباتی چون آلکالوئیدها، اسیدهای چرب، ترپنوئیدها، فنول‌ها و فلاونوئیدها، در جلوگیری از حملات مکرر آنفولانزا و سرماخوردگی مفید است (۷۸). همان‌گونه که ذکر گردید نمونه مورد مطالعه، حاوی ترکیبات زیست‌فعالی است که بر اساس متون پیشین، دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی چشمگیری در برابر طیف فراوانی از باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشند که بخشی از فعالیت ضدمیکروبی میوه رملک را می‌توان به آن‌ها نسبت داد.

نتیجه‌گیری

آنالیز GC-MS نمونه، متابولیت‌های ثانویه متنوع با ساختارهای شیمیایی و زیست فعال مختلف مانند آلکالوئیدها، ترپن‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب مفید،

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را نشان داد. براساس نتایج، عصاره زیزیفوس فعالیت مهاری و کشنده قابل توجهی را در برابر سویه‌های میکروبی مورد مطالعه نشان داد و عصاره، دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی در برابر مخمر کاندیدا آلبیکنس بود. وجود ترکیبات ضدمیکروبی شناسایی شده توسط GC-MS، نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره را تأیید نمود؛ همچنین عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. این میوه، می‌تواند به‌عنوان غذای عملگرای بالقوه و یک بسته غذا- دارویی مطرح باشد و یا در غنی‌سازی مواد غذایی دیگر از آن بهره برد؛ همچنین، با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی مطلوب، این ماتریکس ارزشمند می‌تواند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی باشد.

این مطالعه تحت حمایت مالی سازمان و یا مؤسسه‌ای انجام نگردیده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

References:

1.Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, et al. Trends in Alternative Medicine Use in The United States, 1990-1997: Results of A Follow-Up National Survey. JAMA 1998; 280(18): 1569-75.

2.Mozafarian V. Classification of Plant Morphology and Taxonomy. Tehran: Amir Kabir Publications, 2010, 512.

3.Wang F, Sun X, Dong J. et al. A primary study of breeding system of *Ziziphus jujuba* var. spinosa. Sci Rep 2021;11: 10318. https://doi.org/10.1038/s41598-021-89696-1.

4.Dahiru D, Sini JM, John-Africa L. Antidiarrhoeal Activity of *Ziziphus Mauritiana* Root Extract In Rodents. Afr J Biotechnol 2006; 5(10): 941-5.

5.Motamedi H, Safary A, Maleki S, et al. *Ziziphus spina-christi*, a Native Plant from Khuzestan, Iran, as a Potential Source for Discovery New Antimicrobial Agents. Asian J Plant Sci 2009; 8(2): 187-90.

6.Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A Review on Antioxidants and Some of Their Common Evaluation Methods. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120): 188-208. (Persian).

7.Ahmadi Mousavi E, Manochehri Kalantari K, Jafari S. Change of some osmolytes accumulation in water-stressed colza (*Brassica napus* l.) as affected by 24-epibrassinolide. Iran J Sci Technol Trans. 2009; 31:A1-1. Doi: 10.22099/Ijsts.2
009.2197.

8.Young IS, Woodside JV. Antioxidants In Health and Disease. J Clin Pathol 2001; 54(3): 176-86.

9.Negi PS. Plant Extracts for The Control of Bacterial Growth: Efficacy, Stability and Safety Issues for Food Application. Int J Food Microbiol 2012; 156(1): 7-17.

10.Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. Food Chem Toxicol 1999; 37(9-10): 1027-38.

11.Prior RL, Cao G. Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables. Diet And Health Implications. Hortscience 2000; 35(4): 588-92.

12.Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, et al. Content of Redox-Active Compounds (i.e., antioxidants) in Foods Consumed in the United States. Am J Clin Nut 2006; 84(1): 95-135.

13.Dai J, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules 2010; 15(10): 7313-52.

14.Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, et al. Applied Environmental Stresses to Enhance the Levels of Polyphenolics in Leaves of Hawthorn Plants. Physiol Plant 2004; 121(2): 182-6.

15.Amany MB, Shaker MA, Hoda AF. Utilization from fruits and leaves of napek (*Zizyphus spinachristi* l.) as a source of bioactivecomponents. Banat's J Biotechnol. 2013; 4(7): 16. DOI: 10.7904/2068–4738–IV(7)–16.

16.Khorramizadeh M, Esmail-Nazari Z, Zarei-Ghaane Z, et al. Umbelliprenin-Coated Fe_3O_4 Magnetite Nanoparticles: Antiproliferation Evaluation on Human Fibrosarcoma Cell Line (HT-1080). Mater Sci Eng C 2010; 30(7): 1038-42.

17.Asgarpanah J, Haghighat E. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Ziziphus spina christi* (L.) Willd. AJPP 2012; 6(31): 2332-39. DOI: 10.5897/AJPP12.509.

18.Nazif NM. Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. Fruits and Their Antimicrobial Activity. Food Chem 2002; 76(1): 77-81.

19.Mohebbi GH, Vatanpour H, Vazirizadeh A, et al. Phospholipase A2 Activity of The Persian Gulf Upside-Down Jellyfish Venom (*Cassiopea andromeda*). Iran South Med J 2017; 20(3): 287-300. (Persian).

20.Lesjak MM, Beara IN, Orčić DZ, et al. Phytochemical Composition and Antioxidant, Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. J Funct Food 2014; 7: 257-68.

21.Elya B, Yasman, Edawati Z. Antioxidant Activity of The Ascidian Marine Invertebrates, Didemnum SP. Int J App Pharm 2018; 10(1): 81-6.

22.Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis; Automation and Comparison with Manual Methods. Am J Enol Viticult 1977; 28: 49-55.

23.Asayesh G, Mohebbi GH, Nabipour I, et al. Secondary Metabolites from The Marine Tunicate "*Phallusia nigra*" and Some Biological Activities. Biol Bull 2021; 48(3): 263-73.

24.Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Vasiee A, et al. *Oliveria decumbens* Essential Oil: Chemical Compositions and Antimicrobial Activity Against the Growth of Some Clinical and Standard Strains Causing Infection. Microb Pathog 2018; 114: 449-52.

25.Kolahi Marand S, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, et al. Inhibitory and Bactericidal Effects of Artichoke (*Cynara scolymus*) on Pathogenic Strains and Their Comparison with Antibiotics In Vitro. Qom Univ Med Sci J 2016; 10(2): 32-42. (Persian).

26.Nayaka MAH, Sathisha UV, Dharmesh MS. Cytoprotective and Antioxidant Activity of Free, Conjugated and Insoluble-Bound Phenolic Acids from Swallow Root (*Decalepis hamiltonii*). Food Chem 2010; 119(4): 1307-12.

27.Suleria HA, Osborne S, Masci P, et al. Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries. Mar Drugs 2015; 13(10): 6336-51.

28.Abass MF, AL-Niami JH, AL-Ani RF. Some Physiological Characteristics of Fruit of Jujube (*Zizyphus spina-christi* willd) at Different Stages of Maturity. J Hortic Sci 1988; 63(2): 337-9.

29.Choe E, Min BD. Mechanisms of Antioxidants in The Oxidation of Food. Compr Rev Food Sci F 2009; 8(4): 345-58.

30.Uttara B, Singh AV, Zamboni P, et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. Curr Neuropharmacol 2009; 7(1): 65-74.

31.Chen CF, Lee JF, Wang D, et al. Water Extract of Zizyphus Jujube Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Liver Injury in

Rats (PP106). Transplant Proc 2010; 42(3): 741-3.

32.Goyal R, Sharma PL, Singh M. Possible Attenuation of Nitric Oxide Expression in Anti-Inflammatory Effect of *Ziziphus jujuba* in Rat. J Nat Med 2011; 65(3-4): 514-8.

33.Roginsky V, Lissi EA. Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food. Food Chem 2005; 92(2): 235-54.

34.Singh V, Guizani N, Essa MM, et al. In Vitro Antioxidant Activities of *Ziziphus Spinachristi* Fruits (Red Date) Grown in Oman. Biotechnol 2012; 11(4): 209-16.

35.Setorki M. Effect of hydro-alcoholic extract of *Ziziphus spina-christi* against Scopolamine-Induced Anxiety in Rats. Bangladesh J Pharmacol 2016; 11(2): 421-7.

36.Alothman M, Bhat R, Karim AA. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Selected Tropical Fruits from Malaysia, Extracted with Different Solvents. Food Chem 2009; 115(3): 785-8.

37.Shukla S, Mehta A, Bajpai VK, et al. In Vitro Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Ethanolic Leaf Extract of Stevia Rebaudiana Bert. Food Chem Toxicol 2009; 47(9): 2338-43.

38.Sun L, Zhang J, Lu X, et al. Evaluation to The Antioxidant Activity of Total Flavonoids Extract from Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food Chem Toxicol 2011; 49(10): 2689-96.

39.Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. Free Radical Scavenging Capacity and Inhibition of Lipid Oxidation of Wines, Grape Juices and Related Polyphenolic Compounds Constituents. Food Res Int 1999; 32(6): 407-12.

40.Maganha EG, Da Costa Halmenschlager R, Rosa RM, et al. Pharmacological Evidences for The Extracts and Secondary Metabolites from Plants of The Genus Hibiscus. Food Chem 2010; 118(1): 1-10.

41.Sharma RK, Samant SS, Sharma P, et al. Evaluation of Antioxidant Activities of *Withania somnifera* Leaves Growing in Natural Habitats of North-West Himalaya, India. J Med Plant Res 2012; 6(5): 657-61.

42.Aman S, Naim A, Siddiqi R, et al. Antimicrobial Polyphenols from Small Tropical Fruits, Tea and Spice Oilseeds. Food Sci Technol Int 2014; 20(4): 241-51.

43.Rastegar S, Hassanzadeh Khankahdani H. Evaluation of some quantity and quality properties of 11 *Ziziphus* genotypes fruit of Hormozgan province. J Plant Prod. 2015; 38(3): 105-11. doi: 10.22055/ppd.2015.11458.

44.Chiti S, Basiri S, Mortazavi A, et al. Evaluation on Physicochemical Properties and Antioxidant Capacity of Two Iranian Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) Cultivars. JMPB 2019; 1: 85-93.

45.Gupta D, Mann S, Jain I, et al. Phytochemical, Nutritional and Antioxidant Activity Evaluation of Fruits of *Ziziphus nummularia* Burm. Int J Pharma Bio Sci 2011; 2(4): 629-38.

46.Wink M (ed). Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, 2nd edn, Annual Plant Reviews, Vol 39. Chichester, UK, Wiley-Blackwell, 2010, ISBN 978-1-4051-8528-8, GBP 120.00. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01716.x

47.Mosaddegh M, Naghibi F, Moazzeni H, etal. Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. J Ethnopharmacol. 2012; 141(1): 80-95. doi: 10.1016/j.jep.2012.02.004.

48.Cynthia FI, Hery S, Akhmad D. Antibacterial and Antioxidant Activities of Pyrogallol and Synthetic Pyrogallol Dimer. Res J Chem Environ 2018; 22: 39-47.

49.Han YH, Kim SZ, Kim SH, et al. Pyrogallol Inhibits the Growth of Lung Cancer Calu-6 Cells Via Caspase-Dependent Apoptosis. Chem Biol Interact 2009; 177(2): 107-14.

50.Khan MTH, Lampronti I, Martello D, et al. Identification of Pyrogallol as An Antiproliferative Compound Present in Extracts from The Medicinal Plant Emblica Officinalis: Effects On In Vitro Cell Growth of Human Tumor Cell Lines. Int J Oncol 2002; 21(1): 187-92.

51.Moreno-Manzano V, Ishikawa Y, Lucio-Cazana J, et al. Selective Involvement of Superoxide Anion, But Not Downstream Compounds Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite, In Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Apoptosis of Rat Mesangial Cells. J Biol Chem 2000; 275(17): 12684-91.

52.Saeki K, Hayakawa S, Isemura M, et al. Importance of A Pyrogallol-Type Structure in Catechin Compounds for Apoptosis-Inducing Activity. Phytochemistry 2000; 53(3): 391-4.

53.Sawada M, Nakashima S, Kiyono T, et al. p53 Regulates Ceramide Formation by Neutral Sphingomyelinase Through Reactive Oxygen Species in Human Glioma Cells. Oncogene 2001; 20(11): 1368-78.

54.Park WH, Han YW, Kim SH, et al. A Superoxide Anion Generator, Pyrogallol Induces Apoptosis in As4.1 Cells Through the Depletion of Intracellular GSH Content. Mutat Res 2007; 619(1-2): 81-92.

55.Ozturk Sarikaya SB. Acethylcholinesterase Inhibitory Potential and Antioxidant Properties of Pyrogallol. J Enzyme Inhib Med Chem 2015; 30(5): 761-6.

56.Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic Effects of Quercetin in Streptozocin-Induced Diabetic Rats. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2003; 135(3): 357-64.

57.Lamien-Meda A, Lamien CE, Compaoré MMY, et al. Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Fourteen Wild Edible Fruits from Burkina Faso. Molecules 2008; 13(3): 581-94.

58.Yang W, Chen Xu, Li Y, et al. Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. Nat Prod Commun 2020; 15(3): 1-13.

59. Liu Y, Nakamura T, Toyoshima T, et al. The Effects of D-allose on Transient Ischemic Neuronal Death and Analysis of Its Mechanism. Brain Res Bull 2014; 109: 127-31.

60.Ishihara Y, Katayama K, Sakabe M, et al. Antioxidant Properties of Rare Sugar D-allose: Effects on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Neuro2A cells. J Biosci Bioeng 2011; 112(6): 638-42.

61.Kushwaha P, Yadav SS, Singh V, et al. Gc-Ms Analysis of Bio-Active Compounds in Methanolic Extract of Ziziphus Mauritiana Fruit. Int J Pharmaceut Sci Res 2019; 10(6): 2911-6.

62.Ju J, Hou R, Zhang P. D-allose Alleviates Ischemia/Reperfusion (I/R) injury in skin flap via MKP-1. Mol Med 2020; 26: 21.

63.Hossain MA, Izuishi K, Maeta H. Protective effects of D-allose Against Ischemia Reperfusion Injury of The Rat Liver. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2003; 10(3): 218-25.

64.Yokohira M, Hosokawa K, Yamakawa K, et al. Potential Inhibitory Effects of D-Allose, A Rare Sugar, on Liver Preneoplastic Lesion Development in F344 Rat Medium-Term Bioassay. J Biosci Bioeng 2008; 105(5): 545-53.

65.Kanaji N, Kamitori K, Hossain A, et al. Additive Antitumour Effect of D Allose in Combination with Cisplatin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Oncol Rep 2018; 39(3): 1292-8.

66.Aloui ME, Mguis K, Laamouri A, et al. Fatty Acid and Sterol Oil Composition of Four

Tunisian Ecotypes of *Ziziphus zizyphus* (L.) H. Karst. Acta Bot Gallica 2012; 159(1): 25-31.

67.Goncharova NP, Isamukhamedov AS, Glushenkova AI. Glycolipids and phospholipids of the fruit of *Elaeagnus angustifolia*. Chem Nat Compd 1993; 29(5): 569–573. https://doi.org/10.1007/BF00630198.

68.Zhao J, Li SP, Yang FQ, et al. Simultaneous Determination of Saponins and Fatty Acids in *Ziziphus Jujuba* (Suanzaoren) by High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detection and Pressurized Liquid Extraction. J Chromatogr A 2006; 1108(2): 188-94.

69.Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, et al. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus Jujuba* in Mouse Models of Anxiety. J Ethnopharmacol 2000; 72(3): 435-41.

70.Kourakis S, Timpani CA, De Haan JB, et al. Dimethyl Fumarate and Its Esters: A Drug with Broad Clinical Utility? Pharmaceuticals 2020; 13(10): 306.

71.Lima MT, Finelli FG, De Oliveira AVB, et al. Continuous-Flow Synthesis of Dimethyl Fumarate: A Powerful Small Molecule for The Treatment of Psoriasis and Multiple Sclerosis. RSC Adv 2020; 10(5): 2490-4.

72.Yao Y, Miao W, Liu Z, et al. Dimethyl Fumarate and Monomethyl Fumarate Promote Post-Ischemic Recovery in Mice. Transl Stroke Res 2016; 7(6): 535-47.

73.Gill AJ, Kolson DL. Dimethyl Fumarate Modulation of Immune and Antioxidant Responses: Application to HIV Therapy. Crit Rev Immunol 2013; 33(4): 307-59.

74.Tzani MA, Gabriel C, Lykakis IN. Selective Synthesis of Benzimidazoles from *O*-Phenylenediamine and Aldehydes Promoted by Supported Gold Nanoparticles. Nanomaterials 2020; 10(12): 2405.

75.Mohamod AM, Redayan MA, Ali WB. Synthesis, Characterization and Antibacterial Evaluation of Some Novel Bis Benzimidazole Derivatives. IOP Conf J Phys Conf Ser 2019; 1294: 052012.

76.Beg MA, Teotia UVS, Farooq S. In Vitro Antibacterial and Anticancer Activity of Ziziphus. J Med Plant Stud 2016; 4(5): 230-3.

77.Padalia H, Chanda S. Characterization, Antifungal and Cytotoxic Evaluation of Green Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Using *Ziziphus nummularia* Leaf Extract. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2017; 45(8): 1751-61.

78.Kumar S, Garg VK, Sharma PK. A Review on *Ziziphus nummularia*. Pharmacologyonline 2010; 2: 565-74.

Original Article

Evaluation of Some Phytochemical, Nutraceutical, and Antimicrobial Properties of *Ziziphus Nummularia* Fruit Extract

Gh. Ahmadi (MSc)[1*], T. Khalifeh (MSc)[1], N. Mobaraki (PhD)[1], Gh. Mohebbi (PhD)[1**], AR. Barmak (PhD)[1]

[1] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 16 Mar, 2022 Accepted 31 May, 2022)

Abstract

Background: Recent trends in the production of functional foods and nutraceutical compounds indicate the important role of bioactive molecules in the treatment of human diseases. In this study, some phytochemical and nutraceutical properties of *Ziziphus nummularia* fruit extract harvested from the Poshtpar-Dashtestan forests were evaluated.

Materials and Methods: The antioxidant activity and total phenolic content of *Ziziphus nummularia* fruit extract were studied by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and spectrophotometric methods, respectively. The secondary metabolites were analyzed by the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. The antimicrobial activities of the aqueous extracts against gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*; gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*; mold *Aspergillus nige*r and yeast *Candida albicans* were evaluated using the microdilution method.

Results: The GC-MS analysis of the sample identified 51 chemical compounds with different chemical and bioactive structures, such as alkaloids, terpenes, and steroids. Furthermore, the *Ziziphus* extract showed significant inhibitory and lethal activities against the microbial strains, with its highest antimicrobial activity against *Candida albicans*. The presence of antimicrobial compounds detected by GC-MS confirmed the results of the antibacterial activity of the extract.

Conclusion: According to the results, the *Ziziphus nummularia* extract can be an appropriate terrestrial source of antimicrobial compounds with significant performance against foodborne pathogens. Consistent with the literature, the secondary metabolites from the Ziziphus extract have potential biological and nutraceutical effects which require more laboratory studies.

Keywords: Antioxidant, Antimicrobial, Gas chromatography-Mass spectrometry, Nutraceutical, *Ziziphus nummularia*.

©Iran South Med J. All right sreserved

Cite this article as: Ahmadi Gh, Khalifeh T, Mobaraki N, Mohebbi Gh, Barmak AR. Evaluation of Some Phytochemical, Nutraceutical, and Antimicrobial Properties of Ziziphus Nummularia Fruit Extract. Iran South Med J 2022; 25(2): 130-155

[**]*Address for correspondence*: The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
E.mail: mohebbihsn@yahoo.com
[*]ORCID: 0000-0003-1680-8162
[**]ORCID: 0000-0003-3393-702X