

شناسایی و مقایسه اجزای شیمیایی عصاره‌های متفاوت برگ سدر استخراج شده با روش‌های متفاوت و فعالیت پادباکتری آن‌ها نسبت به تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

نیکو حقانی زاده^۱، الهام حسینی^{۲*} و فروزنده رزاقیان^۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی دارویی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. استادیار شیمی آلی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

اثرهای جانبی مضر داروهای شیمیایی، مقاوم شدن میکروب‌ها به پادزیست‌ها، فراوانی گیاهان و اثبات بی‌ضرربودن بیشتر داروهای گیاهی، موجب تاکید سازمان بهداشت جهانی بر جایگزینی مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی، به‌ویژه در صنایع بهداشتی و دارویی شده است. از آنجایی که عصاره‌های گیاهی منابع بسیار خوب پادباکتری هستند، در این پژوهش، عصاره‌های اتانولی و n -هگزانی پودر سدر (*Zizyphus spina-christi*.L) با دو روش خیساندن و سوکسله، استخراج و اجزای آن‌ها با دستگاه GC/MS شناسایی و مقایسه شدند. اسکوالن و فیتول به مقدار چشمگیری در هر چهار عصاره دیده شدند. اثرهای پادباکتری عصاره‌های استخراجی با روش رقت بر سه سویه باکتری گرم مثبت: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلیوس سوبتیلیس* و *انتروکوکوس فاسالیس* و سه سویه باکتری گرم منفی: *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* بررسی شدند. نتیجه‌های آزمون MIC نشان داد که بیشترین مهارکنندگی را عصاره اتانولی به-دست‌آمده از روش سوکسله و کمترین مهارکنندگی را عصاره n -هگزانی به‌دست‌آمده با همین روش بر همه باکتری‌های موردآزمون داشتند. همچنین، نتیجه‌های آزمون MBC نشان داد که عصاره‌های اتانولی به‌خوبی قابلیت از بین بردن همه سویه باکتری‌های گرم مثبت و یک مورد از باکتری‌های گرم منفی موردآزمون را داشتند.

واژه‌های کلیدی: پودر سدر (*Zizyphus spina-christi*. L)، عصاره، سوکسله، خیساندن، MIC، MBC.

در سال‌های اخیر، گرایش به طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی، به دلیل مشاهده اثرهای جانبی مضر داروهای شیمیایی و بی‌ضرر بودن بیشتر داروهای گیاهی، بیشتر شده است. امروزه ترکیبی از دانش تجربی درمانگران قدیم و پژوهش‌های پژوهشگران جدید، راه را برای استفاده بیشتر از گیاهان دارویی هموار کرده است، همچنین، تاکید سازمان بهداشت جهانی (WHO) بر جایگزینی تدریجی مواد موثر طبیعی به جای مواد شیمیایی در صنایع غذایی، بهداشتی، آرایشی و دارویی موجب شده است تا کشورها به سرمایه‌گذاری و برنامه‌ریزی برای تولید فراورده‌های یادشده بر پایه ترکیب‌های طبیعی اقدام ورزند [۱ تا ۳]. برپایه آمار این سازمان با توجه به افزایش تمایل مصرف فراورده‌های طبیعی، استفاده از ترکیب‌های گیاهان معطر به عنوان پاداکسنده، پادمیکروب و پادباکتری در صنایع غذایی، بهداشتی و دارویی در حال توسعه است [۴].

یکی از گیاهان دارویی با ارزش، برگ درخت کُناَر یا سدر است که با نام علمی *Ziziphus spina-christi* شناخته می‌شود. این گیاه از تیره عنابیان^۲ است و تاکنون ۵۰ جنس و ۶۰۰ گونه از آن در مناطق گرمسیر و نیم‌گرمسیری شمال آفریقا، جنوب و جنوب غرب آسیا، مانند مناطقی از کشورهای عراق و عربستان، نقاطی از آفریقای شمالی و زاگرس ایران دیده شده است. در ایران این گیاه قسمت وسیعی از پوشش گیاهی دشت‌های استان‌های فارس، ایلام، بوشهر، خوزستان، کرمان، سیستان و بلوچستان و هرمزگان را در بر می‌گیرد [۵]. میوه، شکوفه و حتی ریشه این گیاه ویژگی دارویی دارند، ولی برگ آن بیشترین ویژگی دارویی و کاربرد را دارد و بهترین زمان برداشت آن اواخر تابستان است. از این گیاه در طب سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها و عفونت‌ها، جلوگیری از ریزش مو، التیام زخم‌ها و درمان انواع اگزما استفاده شده است. امروزه در فراورده‌های آرایشی-بهداشتی متفاوت، از سدر به صورت افشرد، پودر، شامپو، صابون و روغن استفاده می‌شود. همچنین، ویژگی پادباکتری و پاداکسنده این گیاه به درمان بیماری پسوریازیس^۳ کمک می‌کند [۶ تا ۹].

مطالعه‌های زیستی و فارماکولوژی زیادی بر روی اثرهای پادمیکروبی عصاره الکلی پوست ساقه سدر [۱۰]، اثرهای پادمیکروبی و پاداکسنده اسانس ساقه این گیاه [۱۱]، فعالیت و اثرهای پادمیکروبی عصاره برگ‌های سدر به عنوان درمان کننده بیماری کرونا [۱۲]، فعالیت پادباکتری عصاره الکلی برگ گیاه سدر [۱۳] و بررسی مقدار پروتئین و اسیدهای چرب موجود در دانه گیاه و اثر آن بر سویه‌هایی از باکتری‌ها [۱۴] انجام شده است. این مطالعه‌ها تاییدکننده وجود ترکیب‌های ساپونینی، تانن، استرول‌های گیاهی، آلکالوئیدها و ویتامین‌های A, B, C و E در گیاه سدر است. فراوانی و شناخته‌بودن برگ سدر در همه نقاط ایران از گذشته‌های دور و شناخت اثرهای فارماکولوژی بسیار این گیاه موجب انتخاب آن در این کار پژوهشی شد.

از آنجایی که همه اجزای موجود در گیاهان، ویژگی مؤثر موردنظر قابل توجهی ندارند، روش‌های متفاوتی برای جداسازی اجزای فعال از اجزای غیرفعال یا بی‌اثر بافت‌های گیاهی با دستورالعمل‌های استخراجی استاندارد وجود دارد. یکی از این روش‌ها، عصاره‌گیری از گیاهان است، عصاره یکی از شکل‌های دارویی گیاهان است که به صورت خوراکی مصرف می‌شود و شامل همه مواد موثر گیاه مانند موسیلاژ، تانن،

1. World Health Organization (WHO)
2. Rhamnaceae
3. Psoriasis

ویتامین‌ها و املاح فراوان است. عصاره‌های گیاهی با حلال‌های مناسب و روش‌های متفاوت به‌دست می‌آیند و فراورده به‌دست آمده شامل مجموعه ترکیب‌هایی است که برپایه نوع حلال مصرفی و روش‌های گوناگون استخراجی، متفاوت است [۱۵].

در این پژوهش، ابتدا عصاره‌های سدر با دو حلال اتانول و هگزان نرمال به روش‌های خیساندن^۱ و سوکسله^۲ به‌دست آمدند. سپس، اجزای شیمیایی آن‌ها شناسایی و مقایسه شدند. همچنین، اثرهای پادباکتری عصاره‌های به‌دست‌آمده بر سه سویه باکتری گرم مثبت و سه سویه باکتری گرم منفی بررسی شدند.

بخش تجربی

جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه

برگ سدر مورد استفاده در این پژوهش، اواخر فصل بهار سال ۱۴۰۱ از درخت‌های کنار شهرستان دزفول در استان خوزستان جمع‌آوری و با رعایت اصول اولیه، پس از قرارگرفتن در سایه و دور از نور مستقیم خورشید در مدت دو هفته خشک و سپس آسیاب شد.

روش عصاره‌گیری خیساندن

۵۰ گرم پودر خشک‌شده سدر در داخل دو ارنل یک لیتری مجزا ریخته و به هر کدام ۵۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول ۹۶ درصد و هگزان نرمال خالص افزوده شد. سپس، در ارنل‌ها محکم بسته و به‌مدت ۳ روز با هم‌زدن‌های متوالی بر روی تکاننده^۳ در دمای اتاق قرار داده شدند و پس از آن مخلوط‌ها صاف شدند. پس از جداسازی عصاره‌ها، حلال‌ها با دستگاه تبخیرکن چرخان^۴ و سپس هر کدام در داخل ظروف شیشه‌ای دربسته جداگانه درون یخچال نگهداری شدند [۱۶].

روش عصاره‌گیری سوکسله

۵۰ گرم پودر خشک‌شده سدر در داخل دو بالن ته‌گرد یک لیتری به‌طور جداگانه ریخته و به هر کدام ۵۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول ۹۶ درصد و هگزان نرمال افزوده شد. سپس، به مدت ۸ ساعت عملیات سوکسله و عصاره‌گیری بر روی آن‌ها انجام شد. پس از سرد شدن مخلوط و جداسازی عصاره‌ها، حلال‌ها با دستگاه خلأ چرخان تبخیر و سپس، هر کدام از عصاره‌ها در داخل ظروف شیشه‌ای دربسته جداگانه درون یخچال نگهداری شدند [۱۶].

جداسازی و شناسایی اجزای عصاره‌ها

برای شناسایی ترکیب‌های موجود در عصاره‌های برگ سدر، سوانگاری گازی-جرمی (GC-MS^۵) به‌کارگرفته شد. دستگاه سوانگاری گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مورد استفاده، مدل Agilent 7890/5977، دارای گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونش ۷۰ eV، مجهز به ستون پلی‌متیل سیلوکسان^۶ (HP-5MS) با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی

1. Maceration
2. Soxhlet
3. Shaker
4. Rotary
5. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)
6. Polymethylsiloxane

۰/۲۵ میکرومتر بود. برنامه‌ریزی دمایی ستون با دمای اولیه ۶۰ درجه سلسیوس و توقف ۵ دقیقه در این دما و سپس افزایش دما با سرعت ۵ درجه سلسیوس در دقیقه تا ۲۵۰ درجه سلسیوس بود.

فعالیت پادباکتری

همه باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش از آزمایشگاه میکروبیولوژی و زیست‌فناوری دانشگاه تهران تهیه، و اثرهای پادباکتری عصاره‌های متفاوت پودر سدر، بر سه سویه باکتری استاندارد گرم مثبت^۱ (G+) به نام‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*^۲ (ATCC25923)، *باسیلیوس سوبتیلیس*^۳ (ATCC6633)، *انتروکوکوس فاسالیس*^۴ (PTCC1237) و سه سویه باکتری استاندارد گرم منفی^۵ (G-) با عناوین *اشیرشیاکلی*^۶ (ATCC8739)، *سودوموناس آروژینوزا*^۷ (ATCC9027) و *کلبسیلا پنومونیه*^۸ (ATCC13048) با روش رقت بررسی شدند. در این روش، آزمون سنجش MIC^۹، کمینه غلظت مهارکنندگی باکتری و آزمون سنجش MBC^{۱۰}، کمینه غلظت باکتری‌کشی را مشخص می‌کنند.

روش‌های تعیین فعالیت‌های پادباکتری

برای تعیین و بررسی اثرهای پادباکتری پودر سدر از روش رقیق‌سازی (رقت مایع) استفاده شد. به این منظور ۱۲ عدد میکرولوله سترون شده برای هر سویه باکتری انتخاب و در هر کدام ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت BHI^{۱۱} آگاردار ریخته شد. به منظور انجام آزمون‌های MIC و MBC برای هر سویه باکتری و هر نوع عصاره، مقدار ۸/۳۲ میلی گرم از هر کدام از عصاره‌های استخراج شده در ۱ میلی لیتر سرم سترون (مقدار ۳۰۰λ در ۱ میلی لیتر) حل و مخلوط شد. سپس، غلظت‌های ۰/۰۸، ۰/۱۶، ۰/۰۳۳، ۰/۰۶۵، ۰/۱۳۰، ۰/۲۶۰، ۰/۵۲۰، ۱/۰۴۰، ۲/۰۸۰ و ۴/۱۶۰ mg/ml در محیط کشت‌های آماده شده در میکرولوله‌ها تهیه شدند.

در ادامه ۲۵ میکرولیتر از محلول استاندارد نیم‌مک‌فارلند^{۱۲} از هر شش سویه باکتری موردنظر که پیش از این به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت نوترینت براث^{۱۳} (NB)، کشت داده شده بودند، درون میکرولوله‌ها ریخته شدند و ۲ میکرولوله به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت + باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت + عصاره) در نظر گرفته شد. سپس، همه میکرولوله‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت درون گرم‌خانه^{۱۴} با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از این مدت درون هر میکرولوله ۱۲۵ میکرولیتر از محلول تترازولیم کلرید افزوده شد و پس از قرارگیری دوباره میکرولوله‌ها درون گرم‌خانه، پس از ۳ تا ۴ ساعت، تغییر رنگ پدیدار شد. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ

-
1. Gram positive
 2. *Staphylococcus aureus*
 3. *Bacillus subtilis*
 4. *Enterococcus faecalis*
 5. Gram negative
 6. *Escherichia coli*
 7. *Pseudomonas aeruginosa*
 8. *Klebsiella pneumoniae*
 9. Minimum inhibitory concentration (MIC)
 10. Minimum bactericidal concentration (MBC)
 11. Brain heart infusion (BHI)
 12. McFarland
 13. Nutrient broth
 14. Incubator

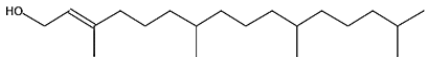
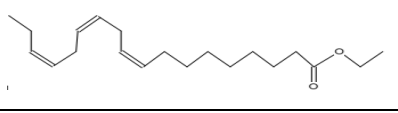
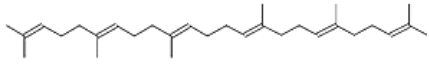
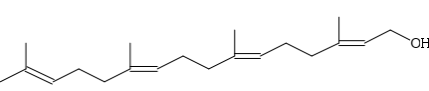
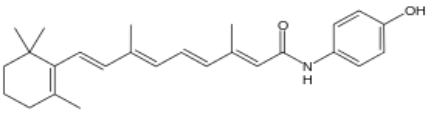
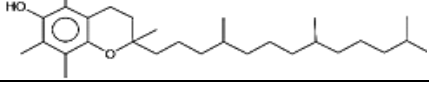
صورتی تترازولیم را به خود بگیرد، به عنوان MIC و غلظتی از ماده که در آن رشد ریزاندامگان‌ها مشاهده نشود به عنوان MBC گزارش شد [۱۶].

نتیجه‌ها و بحث

استخراج عصاره‌ها

مطالعه و بررسی داده‌های GC/MS عصاره‌های متفاوت به دست آمده از پودر سدر نشان داد که اصلی‌ترین اجزای استخراج شده با اتانول ۹۶ درصد در هر دو روش خیساندن و سوکسله، ۷ ترکیب با مقدار تقریبی ۹۱ درصد از کل مواد و مواد به دست آمده از استخراج با هگزان نرمال در دو روش خیساندن و سوکسله، به ترتیب ۳ و ۴ ترکیب با مقدار تقریبی ۹۴ درصد از کل مواد بود. عمده‌ترین ترکیب‌های به دست آمده از هر چهار روش در جدول ۱ گزارش شده است. ترکیب‌های به دست آمده ویژگی‌های دارویی مشخصی دارند. برای مثال، فیتول برای بیماری‌های التهابی دردناک و به طور معمول به عنوان واکنشگر برای ساخت شکل‌های مصنوعی ویتامین‌های E و K1 استفاده می‌شود. اسکوالن در محافظت و نرمی پوست و در چندین واکنش به عنوان ماده کمکی، نقش دارد. کامفور تحریک کننده اعصاب و یکی از داروهای متداول برای کمک به درمان سرفه و تحریک‌های پوستی، به ویژه درد و خارش جای نیش حشرات و آکنه است [۱۷ تا ۱۹]. اتیل لینولات، یکی از اسیدهای چرب ضروری موجود در امگا ۶ است. کمبود این اسید چرب در بدن موجب ریزش مو، پوسته پوسته شدن پوست و تأخیر در بهبود زخم‌ها می‌شود [۲۰]. ویتامین E برای سلامت پوست و موها اهمیت بسیاری دارد و می‌تواند به تغذیه صحیح مو، درمان موخوره و جلوگیری از ریزش مو کمک کند. همچنین، به درمان آفتاب سوختگی، کاهش چین و چروک، پاکسازی پوست، درمان آگزما و ترک پوست کمک و از تشکیل لخته‌های خون در شریان‌های قلب جلوگیری می‌کند [۲۱ و ۲۲]. وجود این اجزا در پودر سدر، می‌تواند دلیل توصیه دائمی طب سنتی به استفاده از این گیاه برای درمان ریزش و درخشندگی مو و شفاف سازی و بهبود بیماری‌های پوستی باشد [۷ تا ۹ و ۱۴].

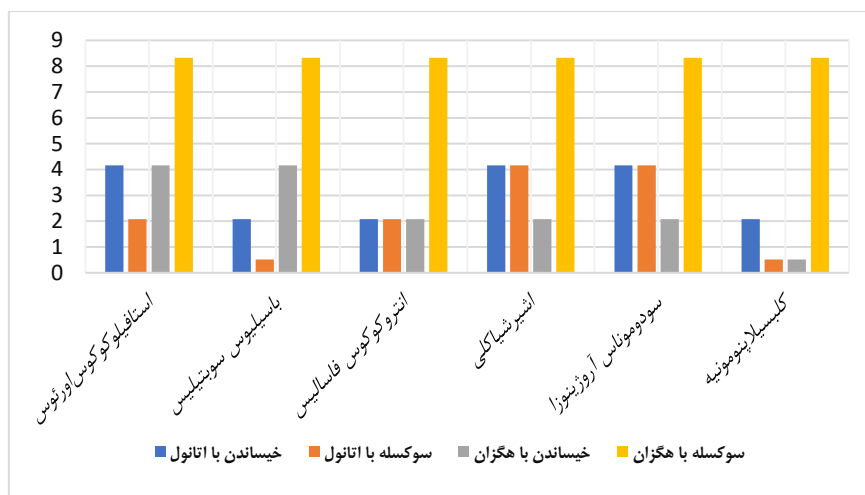
جدول ۱ فراوان‌ترین اجزای موجود در عصاره پودر سدر استخراج‌شده با حلال‌ها و روش‌های متفاوت

ردیف	نام ترکیب - نوع ماده مؤثر	ساختار ترکیب	درصد اتانول		درصد هگزان نرمال	
			خیساندن	سوکسله	خیساندن	سوکسله
۱	کامفور ^I (مونوترپنئید)		۴۱٫۳۵	۳۹٫۶۷		
۲	فیتول ^{II} (دی‌ترین‌الکی-واکنشگر ساخت ویتامین E و K - پادمیکروب)		۱۴٫۷۵	۱۵٫۶۵	۹٫۳۸	۱۵٫۶۰
۳	اتیل لینولات ^{III} (استر اسید چرب - مؤثر در متابولیت گیاهان و انسان)		۱٫۷۲	۲٫۲۲		
۴	اسکوالن ^{IV} (تری‌ترین - واکنشگر ساخت استروئیدها - موجود در روغن ماهی)		۱۸٫۳۹	۱۴٫۵۲	۰٫۷۸۱	۰٫۳۵۶۲
۵	ژرانیل ژرانول ^V (دی‌ترین‌الکی - واسطه ستر دی‌ترین‌ها و ویتامین E و K - فراورده نفتی)		۲٫۶۰		۶٫۹۲	
۶	فینرتینید ^{VI} (مؤثر در درمان سرطان و آرتریت روماتوئید - پیش‌ماده ساخت ویتامین A)		۳٫۰۵			
۷	ویتامین E		۹٫۱۸	۶٫۵۳		
۸	دودکان (مؤثر در دگرگشت ^{VII} گیاهان)			۶٫۱۲		
۹	۱-ایکوزانول ^{VIII} (الکل چرب - فراورده نفتی)			۵٫۰۵		۱۷٫۸۳
۱۰	اُکتادکانال (آلدئید چرب - فرمون جنسی چند گونه حشره)					۲۵٫۰۷

I. Camphor II. Phytol III. Ethyl Linoleate IV. Squalene V. Geranyl Geraniol VI. Fenertinide VII. Metabolism VIII. Eicosanol

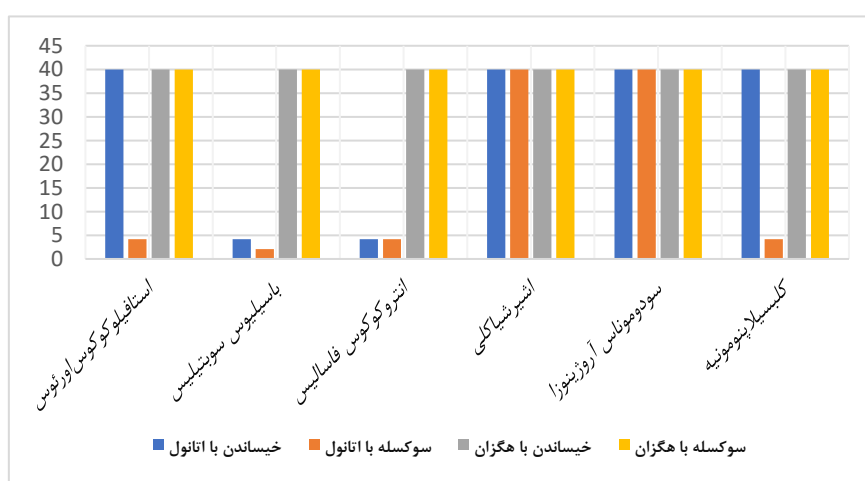
بررسی فعالیت پادباکتری

نتیجه‌های آزمون‌های پادباکتری بر روی چهار نوع عصاره به‌دست‌آمده از پودر سدر در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. نتیجه‌های آزمون‌های MIC در شکل ۱ نشان می‌دهد که عصاره اتانولی به‌دست‌آمده از روش خیساندن بیشترین اثر بازدارندگی را بر باکتری‌های *باسیلیوس سوبتیلیس*، *انتروکوکوس فاسالیس* و *کلبسیلا پنومونیه* و عصاره اتانولی به‌دست‌آمده از روش سوکسله، مهارکنندگی بسیار زیادی بر *باسیلیوس سوبتیلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* دارد. همچنین، این نمودار نشان می‌دهد که عصاره هگزانی به‌دست‌آمده از روش خیساندن اثر بازدارندگی بسیار چشمگیری بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* دارد، در صورتی که عصاره هگزانی به‌دست‌آمده از روش سوکسله، هیچ‌گونه اثر مهارکنندگی بر هیچ یک از ۶ سویه باکتری مورد آزمون ندارد.



شکل ۱ نتیجه‌های آزمون MIC انواع عصاره‌های برگ گیاه سدر

نتیجه‌های آزمون‌های MBC هر چهار نوع عصاره استخراجی پودر سدر نیز در شکل ۲ نشان می‌دهد که عصاره اتانولی به‌دست‌آمده از روش خيساندن به خوبی قابلیت کشندگی دو باکتری *باسیلیوس سوبتیلیس* و *انتروکوکوس فاسالیس* را دارد. همچنین، عصاره اتانولی به‌دست‌آمده از روش سوكسله نیز قابلیت کشندگی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلیوس سوبتیلیس*، *انتروکوکوس فاسالیس* و *کلبسیلا پنومونیه* را به‌خوبی دارد. نتیجه‌های این آزمون بیانگر این است که عصاره‌های هگزانی استخراج‌شده از هر دو روش، قابلیت کشندگی هیچ کدام از ۶ سویه باکتری مورد آزمون را ندارند. این نتیجه‌ها می‌تواند بیانگر وجود ترکیب‌های کامفور، اتیل لینولئات و ویتامین E موجود در فراورده استخراجی اتانولی باشد که در فراورده استخراج هگزان نرمال دیده نمی‌شوند. بررسی نتیجه‌های بسیاری از مطالعه‌ها در باره اثرهای پادباکتری فراورده‌های طبیعی نیز مانند نتیجه‌های این پژوهش، نشان‌دهنده تأثیرگذاری کمتر مواد استخراجی گیاهان دارویی بر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت است [۲۳ تا ۲۵]. در اصل دلیل این حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی به ترکیب‌های پادباکتری، چندلایه‌ای بودن دیواره سلولی آن‌ها نسبت به تک‌لایه‌ای بودن دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت است [۲۶].



شکل ۲ نتیجه‌های آزمون MBC انواع عصاره‌های برگ گیاه سدر

نتیجه گیری

در این پژوهش، ابتدا اجزای پودر سدر با دو روش خیساندن و سوکسله و دو حلال قطبی (اتانول ۹۶ درصد) و غیرقطبی (هگزان نرمال) استخراج و مقایسه شدند. این مقایسه نشان داد که حلال اتانول در روش سوکسله توانایی جداسازی بیشترین اجزا را از پودر سدر داشت. همه اجزای به دست آمده از هر دو روش و با هر دو حلال، وجود مقدار چشمگیری از اسکوالن و فیتول در چهار عصاره را نشان داد. تفاوت عمده اجزای استخراجی در دو حلال اتانول و هگزان نرمال، وجود ترکیب‌های کامفور، اتیل لینولات و ویتامین E در فراورده استخراجی اتانولی بود که در فراورده استخراج هگزان نرمال دیده نشد. ویژگی پادباکتری چهار نوع عصاره استخراج شده پودر سدر بر ۳ سویه باکتری گرم مثبت و ۳ سویه باکتری گرم منفی نیز مطالعه شد. بهترین اثر مهارکنندگی (MIC) را عصاره اتانولی به دست آمده با روش سوکسله، بر دو باکتری *باسیلیوس سوبتیلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* داشت و در مقابل عصاره هگزانی به دست آمده با روش خیساندن هیچ گونه مهارکنندگی بر هیچ یک از ۶ سویه باکتری مورد آزمون نداشت. نتیجه‌های آزمون‌های کشندگی (MBC) نیز نشان می‌دهد که عصاره اتانولی به دست آمده از روش خیساندن فقط قابلیت کشندگی دو باکتری گرم مثبت *باسیلیوس سوبتیلیس* و *انتروکوکوس فاسالیس* را دارد ولی عصاره اتانولی به دست آمده از روش سوکسله افزون بر قابلیت کشندگی هر ۳ سویه باکتری گرم مثبت، باکتری گرم منفی *کلبسیلا پنومونیه* را نیز از بین می‌برد. همچنین، نتیجه‌های این آزمون بیانگر این است که عصاره‌های هگزانی به دست آمده از هر دو روش استخراجی، قابلیت کشندگی هیچ یک از باکتری‌های مورد آزمون را ندارند.

مراجع

- [1] Shibamoto K, Mochizuki M, Kusuvara M. Aroma therapy in antiaging medicine. *Anti-Aging Med*. 2010;7(6):55-9. doi: 10.2147/CIA.S447514
- [2] van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(4):440-6. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x
- [3] D'Amelio Sr. Botanicals: A phytocosmetic desk reference. Boca Raton: Pub; 1998. doi: org/10.1201/9780367802202
- [4] Tavakoli M, Nemati S. A review of the antibacterial effect of widely used medicinal plants used in Iranian traditional medicine. In: Second International Conference on Medicinal Plants, Organic Agriculture, Natural Resources and pharmaceuticals; 1397; Mashhad. Civilica; 1397. p. 228.
- [5] Ghavam M. Investigating how to evaluate medicinal plants in terms of the presence and amount active compounds. In: First National Conference of Medicinal and Aromatic and Spices Plants; 1395. Available from: <https://sid.ir/paper/884595/fa>.
- [6] Zargari A. Medicinal plants, Vol 1. 7th ed. Tehran: Tehran University Pub; 1997.
- [7] Shahat A, Pieters S, Apers N, Nazeif N, Abdel-Azim D, Berghe, A and Vlietinck A. Chemical and biological investigations on *Zizyphus spina-christi* L. *Phytother. Res J*. 2001;15: 593-597. doi: org/10.1002/ptr.883
- [8] Kalwij JM. Review of the plant list, a working list of all plant species. *Journal of Vegetation Science*. 2012;23(50):998-1002. doi: org/10.1111/j.1654-1103.2012.01407.x

- [9] Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Anthony S. *Zizyphus spina-Christi*. 5 Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009[updated 2015-02-12]. Available from: <http://www.worldagroforestry.org/output/agroforestree-database>.
- [10] Dafni A, Levy S, Lev E. The ethnobotany of Christ's Thorn Jujube (*Zizyphus spina-christi*) in Israel. J Ethnobiol Ethnomed. 2005;1(8):307-308. doi:10.1186/1746-4269-1-8
- [11] N Ads E, Hassan S, Rajendrasozhan S, Hetta M, Aly S, Ali M. Isolation, structure elucidation and antimicrobial evaluation of natural pentacyclic triterpenoids and phytochemical investigation of different fractions of *Zizyphus spina Christi* (L.) stem bark using LCHRMS analysis. Molecules. 2022;27(6):1805. doi: org/10.3390/molecules27061805
- [12] Papari Moghadam Fard M, Ketabchi S, Farjam MH. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of essential oil of *Zizyphus spina-christi* var. *aucheri* grown wild in Iran. Journal of Medicinal Plants and By-products (JMPB). 2020;9(special):69-73. doi: org/10.22092/jmpb.2020.121752
- [13] Taghipour MT, Nameni R, Taghipour M, Ghorat F. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Zizyphus Spina-Christi* and tamarix aphylla leaves' extracts as effective treatment for coronavirus disease 2019 (COVID-19). Thritha J Neu. 2020;9(2). doi: org/10.5812/thrita.107776
- [14] Rante H, Pabisa M, Taebe B. Antibacterial activity of ethanol extract of arabian lotus leaves (*Zizyphus Spina-Christi* L.) and bioautography TLC analysis of several pathogenic bacteria. Journal Bionature. 2023;24(2):231-236. doi: org/10.35580/bionature.v24i2.52766
- [15] Nazif N. Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. Fruits and their antimicrobial activity. Food Chemistry. 2002;76:77-81. doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00243-6
- [16] Haghanizadeh N. Study the effect of different extraction methods on compounds and antibacterial effects of Cedar (*Zizyphus spina-christi* L.) [dissertation]. [Tehran]: Tehran North Branch, Islamic Azad University; 1402. 86p.
- [17] Ernst J, Sheldrick WS, Fuhrhop JH. Crystal structure of squalene. Angewandte Chemie. 1976;88(24):85. doi: 10.1002/anie.197607781
- [18] Abe I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. Natural Product Reports. 2007;24(6):1311–1331. doi.org/10.1039/B616857B
- [19] Micera M, Botto A, Geddo F, Antoniotti S, Berteau C, Levi R, et al. Squalene: More than a step toward sterols. Antioxidants. 2020;9(8):688. doi.org/10.3390/antiox9080688
- [20] Haynes WM. CRC Handbook of chemistry and physics. 97th ed. Boca Raton: CRC Press; 2016. doi: org/10.1201/9781315380476
- [21] Traber M. Vitamin E. Advances in Nutrition. 2021;12(3):1047-1048. doi: 10.1093/advances/nmab019
- [22] Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000.
- [23] Herrera RM, Perez M, Martín-Herrera DA, Lopez-Garcia R, Rabanal RM. Antimicrobial activity of extracts from plants endemics to the Canary Islands. Phytotherapy Research. 1996;10:364-366. doi: org/10.1002/(SICI)1099-1573
- [24] Meng JC, Zhu QX, Tan RX. New antimicrobial mono- and sesquiterpenes from *Soroseris hookeriana subsp, erysimoides*. Planta Medica. 2000;66:541-544. doi: org/10.1055/s-2000-8607

- [25] Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy O. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine, *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;74:217-220. doi: **10.1016/s0378-8741(00)00345-7**
- [26] Palombo EA, Semple SJ. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2001;77:151-157. doi: **10.1016/s0378-8741(01)00290-2**

Identification and comparison of chemical components of various Cedar leaf extracts by using different extraction methods and antibacterial activity of them on some of gram-positive and gram-negative bacteria

N. Haghanizadeh¹, E. Hassibi^{2,*}, F. Razaghian²

1. MSc. Student of Medicinal Chemistry, Department of Chemistry, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Assistant Prof. of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract: The harmful side effects of chemical drugs, the resistance of microbes to antibiotics, the abundance of plants and the proof of the harmlessness of most herbal drugs, made the World Health Organization (WHO) emphasize the replacement of natural substances instead of chemicals, especially in the field of healthcare. Since plant extracts are very good antibacterial sources, in this research, ethanolic and *n*-hexane extracts of Cedar (*Zizyphus spina-christi*. L) were extracted by maceration and Soxhlet extraction methods and their components identified and compared by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Squalene and phytol were significantly found in all four extracts. The antibacterial effects of the extracts were investigated by dilution method on three strains of gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Enterococcus faecalis* and three strains of Gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. The results of the MIC test showed that the ethanolic extract by Soxhlet method had the largest and the *n*-hexane extract by the same method had the lowest inhibition on all bacteria strains in this research. The MBC test results showed that the ethanolic extracts had the ability to destroy all the strains of gram-positive bacteria and one of the gram-negative bacteria.

Keywords: Cedar (*Zizyphus spina-christi*. L), Extract, Soxhlet, Maceration, MIC, MBC.

* Corresponding author Email: e_hassibi@iau-tnb.ac.ir