Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 15(2023-24) 153-165

# The effect of injectional administration of zataria-multiflora boiss L. essence on growth performance and some of serum biochemical parameters in neonatal calves

Jebelli javan, A.[1], Parsaeimehr, M.[1], Mohammadi, M.[2*].

Received: 11.03.2023 Accepted: 11.03.2024

## Abstract

Today, plants with antioxidant and antibacterial properties have attracted the attention of researchers as natural resources. The spinach plant is widely used in various pharmaceutical and food industries. In this research, the effect of different solvents on the number of phenolic compounds, antioxidant activity, and antibacterial properties of various aqueous, alcoholic (ethanolic, methanolic), and hydroalcoholic extracts of spinach plants has been studied. The result showed by changing the type of solvent from polar to non-polar, the extraction rate of phenolic compounds and therefore the antioxidant activity increased significantly ($p<0.05$). So the ethanolic extract with the most non-polar properties has 98.5 mg/100 grams of gallic acid of phenolic compounds, while the aqueous extract has 50.7 and naturally the same difference in the amount of phenolic compounds, the amount of antioxidant properties for the ethanol extract is 135±5 micrograms/ml. if it is 2011 ± 12 micrograms per milliliter for aqueous extract. According to the results, the MIC for the ethanolic extract was 11479 ppm on gram-positive bacteria and 12467 ppm for gram-negative bacteria, and for the aqueous extract, the MIC on gram-positive bacteria was 52380 ppm and for gram-negative bacteria was 64298 ppm. Therefore, in the case of microbial tests, the effect of non-polar extracts was more than that of polar extracts, which confirms that the type of solvent used has a significant effect on the antibacterial properties of different extracts. ($p<0.05$) In general, according to the results of this research, non-polar solvents cause the extraction of more phenolic compounds, and considering the antioxidant and antibacterial effects of these compounds, alcoholic extracts will have more antioxidant and antibacterial ability.

**Keywords**:. Spinach, extract, alcoholic, chemical, microbial.

1. Department of Food Sciences & Engineering, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran.
2. Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University.
*Corresponding author: mohammadym84@gmail.com

# ارزیابی خواص شیمیایی و میکروبی عصاره های الکلی ، هیدروالکلی، متانولی و آبی گیاه *Spinacia oleracea* (سمنان)

جبلی جوان ، ا.[۱]، پارسایی مهر ، م. [۱]، محمدی ، م.[۲*]

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

**خلاصه**

امروزه گیاهان به عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریال هستند، مورد توجه محققین قرار گرفته اند. گیاه اسفناج در صنایع مختلف دارویی و غذایی کاربرد فراوان دارد. در این تحقیق نیز با بررسی تاثیر نوع حلال های مختلف بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد باکتریایی انواع عصاره های مختلف آبی و الکلی( اتانولی ومتانولی) وهیدروالکلی گیاه اسفناج مطالعه انجام شده است. باتوجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات شیمیایی مشخص شد که با تغییر نوع حلال از قطبی به غیر قطبی میزان استخراج ترکیبات فنلی و به طبع آن میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش معنی داری داشت ( $p<0/05$) به طوری که عصاره اتانولی با بیشترین خاصیت غیرقطبی دارای ۹۸,۵ mg بر صد گرم اسید گالیک ترکیبات فنلی میباشد در صورتی که عصاره آبی دارای ۵۰,۷ میباشد و به طبع همین تفاوت در میزان ترکیبات فنلی، میزان خاصیت انتی اکسیدانی برای عصاره اتانول ۵±۱۳۵میکروگرم بر میلی لیتر میباشد در صورتی که برای عصاره آبی۱۲± ۲۰۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر میباشد. طبق نتایج MIC انجام شده برای عصاره اتانولی 11479 ppm بر باکتری گرم مثبت و برای باکتری گرم منفی 12467 ppm بود و برای عصاره آبی میزان MIC بر باکتری گرم مثبت 52380 ppm و برای باکتری گرم منفی 64298 ppm میباشد بنابراین در مورد آزمایشات میکروبی هم تاثیر عصاره های غیرقطبی نسبت به عصاره قطبی بیشتر بود که این نتایج تایید میکند که نوع حلال مصرفی تاثیر معناداری بر خواص ضد باکتریایی عصاره های مختلف دارد.($p<0/05$ ) به طور کلی طبق نتایج این پژوهش حلال های غیرقطبی باعث استخراج بیشتر ترکیبات فنلی میشوند و با توجه به تاثیرات ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی این ترکیبات، عصاره های الکلی توانایی ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی بیشتری خواهند داشت.

**واژه‌های کلیدی**: اسفناج،عصاره، الکلی، شیمیایی، میکروبی.

---

۱. گروه بهداشت و کنترل کیفی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسئول: mohammadym84@gmail.com

## مقدمه

گیاه اسفناج با نام علمی (*Spinacia oleracea*) متعلق به خانواده میخک‌سانان می باشد که در صنایع مختلف دارویی، غذایی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد. اسفناج گیاهی یک ساله، دولپه‌ای و گلدار با ساقه و برگ‌های لطیف است. اسفناج خام حاوی ۹۱درصد آب، ۴درصد کربوهیدرات، ۳درصد پروتئین و مقدار ناچیزی چربی است. اسفناج دارای کالری پایین و ارزش غذایی بالایی است. اسفناج، یکی از سبزیجات محبوب و مفید است که در بسیاری از غذاها به عنوان ماده اصلی یا تزئینی استفاده می‌شود. اسفناج دارای خواصی چون افزایش ایمنی بدن، کاهش التهابات، حفظ سلامت چشم و پوست، کاهش خطر بیماری‌های قلبی و عروقی، تقویت استخوان‌ها و حفظ دستگاه گوارش است.از نظر طب سنتی هم اسفناج، به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی، می‌تواند در پیشگیری از عفونت های باکتریایی و ویروسی و درمان برخی بیماری ها مفید باشد. ترکیبات موجود در عصاره اسفناج از میان ترکیب های شناسایی شده بیشتر شامل، سکرتین، لسیتین ساکارید،ساپونین‌ها، کلروفیل، نیاسین، آرسینیک، ریبوفلاوین، اکسالیک اسید، هیدرات کربن، تیامین، انواع ویتامین‌ها، آهن، فسفر، آب، خاکستر، سدیم، کلسیم و پتاسیم میباشد.(سید عباس میرجلیلی ۱۳۹۹) اسفناج حاوی ترکیبات فنلی، عمدتاً مشتقات پاتولتین، اسپیناستین و گلوکورونیدها است که مسئول طیف وسیعی از خواص بیولوژیکی و عملکردی آنها هستند .فلاونوئیدهای اسفناج دارای فعالیت های ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، آلفا آمیلاز، اتصال اسیدهای صفراوی و ضد التهابی هستند. ( Jashbir Singh 2018) اسانس های گیاهی، اسید چرب فرار گیاه است که با روش های مختلف تقطیر جمع آوری می شود ولی برای تهیه عصاره، گیاه با یک حلال مناسب مخلوط می گردد. بنابراین ترکیبات گیاه بر اساس میزان حلالیت شان در حلال جدا می گردد. برای استخراج پلی فنل ها ازگیاهان، از آب وحلال های آلی مانند اتانول، متانول، استنودیاتیلاتراستفاده می گردد.( Sun T و همکاران ۲۰۰۵) تفاوت های آشکاری بین مقادیرترکیبات فنلی در عصاره های مختلف مشاهده میشود که ناشی از نوع آماده سازی نمونه، روش ومدت زمان استخراج وخواص فیزیکوشیمیایی حلال های به کار رفته می باشد .(بهرامیان و همکاران ۲۰۱۲)با توجه به تاثیر ویژه شرایط محیطی برمتابولیت های ثانویه گیاهان، بررسی ترکیبات و خواص ضد اکسایشی درهرمنطقه ضروری به نظرمی رسد .بهینه سازی روش استخراج و حلالهای مورد استفاده که باعث جداسازی نوع خاصی از ترکیبات شیمیایی می گردد یک عامل تعیین کننده وتاثیرگذار دراندازه گیری فعالیت ضداکسایشی عصاره های گیاهی است . از طرفی گسترش داروهای ضدمیکروبی یکی از مهمترین پیشرفت ها در امر درمان می باشد .عصاره های گیاهی به دلیل داشتن منشاء طبیعی نسبت به آنتی بیوتیک ها سازگاری بیشتر و عوارض کمتری در بدن دارد. (2000 Ainswort. C .) یافتن مواد مؤثرجدید ضدباکتریایی در بین عصاره های گیاهی با هدف شناخت ساختار شیمیایی و غلبه بر معایب کاربرد از آنتی بیوتیک ها در حال گسترش است و گیاه اسفناج یکی از منابع گیاهی جدید مورد بررسی است. (بوهماما و همکاران ۲۰۰۶) همچنین، M aganha در تحقیقی در سال ۲۰۱۰ این موضوع را نشان داده است که منشا بسیاری از مواد دارویی و درمانی به دلیل متابولیسم ثانویه در گیاهان است که پلی -فنولها با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مهمترین گروه از این متابولیتها را شامل میشوند. در پژوهش دیگری که توسط Ock در سال ۲۰۰۹ انجام شد بررسی مقدار فنل تام، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی بر روی تعدادی از سبزیجات خوراکی انجام شد و مشخص گرد ید که مقدار فنل تام اسفناج بیشتر از گوجه فرنگی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس روش پتانسیل آنتی اکسیدانی معادل ترولکس در اسفناج بیشتر از گوجه فرنگی گزارش شد. در پژوهشی که با استفاده از دی فنیل پیکریل هیدرازیل بر روی اسفناج جهت بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی انجام شد، فعالیت آنتی اکسیدانی اسفناج به علت روش عصاره گیری آن می تواند متفاوت باشد. (2005 Shyam ala) با توجه به نوع و روش های مختلف عصاره گیری میتوان دریافت که ترکیبات موثره عصاره قابل استخراج به نوع حلال مصرفی و نحوه استخراج عصاره بستگی دارد. .بررسی دقیق منابع داخل کشور نشان می دهد تا کنون پژوهشی در زمینه تعیین میزان ترکیبات فنلی وخواص آنتی اکسیدانی عصاره بخش های مختلف گیاه اسفناج تحت تاثیرحلال های

مختلف صورت نگرفته است . لذا در این تحقیق ترکیبات فنلی و خواصیت انتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه اسفناج شناسایی گردید و تاثیرحلال های اتانولی ، متانولی ، هیدروالکلی و آبی بر میزان استخراج ترکیبات پلی فنلی، فلاونوییدی برگ گیاه اسفناج بررسی شد و همچنین خواص آنتی اکسیدانی عصاره ها درغلظت های مختلف اندازه گیری شد وپس از اندازه گیری ترکیبات فنلی به بررسی تاثیرات میکروبی تمام این عصاره ها برباکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت و *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (EHEC ) پرداخته شد.

## مواد و روش کار

### مواد و تهیه عصاره

برگ های گیاه اسفناج از شهرستان سمنان تهیه گردید، قسمتهای زائد آن جدا شده و بلافاصله پس از شستشو در سایه خشک گردید. سایر مواد مورد استفاده شامل اتانول، متانول، معرف فولین سیوکالتیو، اسیدگالیک، کربنات سدیم، 2و 2دی فنیل -1 پیکریل هیدرازیل از شرکت های معتبر مرک وسیگما تهیه شد. برای آزمایشات میکروبی هم مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، آب مقطر استریل، محیط کشت های مولرهینتون آگار ، بی اچ آی براث وبی اچ آی آگار از شرکت مرک آلمان، تهیه شد. تهیه عصاره برگ گیاه اسفناج به روش ماسراسیونان (Maceration) انجام شد.برای استخراج عصاره های مختلف ابتدا اسفناج به طور کامل شسته شد و بعد از ابگیری و حذف قسمت های زاید برگ گیاه بدست آمد. جهت خشک کردن برگ اسفناج تازه ابتدا تمام برگ ها به مدت ۲۴ ساعت دور از نور خرشید قرار گرفت سپس در داخل آون با دمای ۲ ±۵۰ به مدت ساعت برگ های اسفناج تازه کاملا خشک شد ، سپس اسفناج های خشک شده با استفاده از دستگاه خرد کن به شکل یک دست و کامل پودر شد. برای تهیه عصاره اتانولی از۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد در ۷۵ گرم پودر گیاه اسفناج استفاده شد وبرای تهیه عصاره هیدروالکلی از ۳۰۰ ml ترکیب اتانول و آب به نسبت ۸۰ به ۲۰ در ۷۵ گرم پودر گیاه اسفناج استفاده شد. برای تهیه عصاره متانولی از ۳۰۰ میلی لیتر متانول خالص در ۷۵ گرم پودر گیاه اسفناج استفاده شد بعد از گذشت ۴۸ ساعت محلول‌های حاوی پودر گیاه اسفناج و هر سه حلال اتانولی، متانولی و هیدروالکلی برای صاف شدن مهیا شد. برای صاف کردن محلول‌ها از کاغذ صافی واتمن به شماره ۴ استفاده شد. بعد از عبور از صافی محلول باقیمانده در دستگاه روتاری و در دمای ۴۵ درجه خشک گردید و عصاره به دست آمده در لوله فالکن کامل استریل قرار گرفت و با فویل پوشانیده شد و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. جهت اماده سازی عصاره آبی ۷۵ گرم پودر گیاه اسفناج به ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه باقی ماند بعداز ۴۸ ساعت محلول آب مقطر و پودر گیاه اسفناج به مدت نیم ساعت یا ۳۰ دقیقه جوشانده شد و پس از آن با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه برای ۴ بار عمل سانتریفیوژ انجام شد سپس محلول به دست آمده در دستگاه روتاری و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفت تا غلظت بالاتری از عصاره به دست بیاید و سپس در لوله فالکن استریل قرار گرفت و با فویل پوشانیده شد و در یخچال بادمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

کشت خالص از باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس ( ATCC 25923)و *اشرشیا کلی* (ATCC25922) به صورت لیوفیلیزه از بخش باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. برای تهیه و فعال سازی میکروارگانیسم ابتدا هر یک از باکتری های لیوفیلیزه مورد آزمون در دو مرتبه متوالی در لوله آزمایش حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت بی اچ آی براث (مرک آلمان) در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ، ۱۶ _ 18 ساعت گرمخانه گذاری شدند تا به حالت رویشی و فعال تبدیل شوند، سپس کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسرول استریل مخلوط و در قسمت های مساوی درلوله های میکروسانتریفیوژ اپندرف استریل در دمای منفی 20 درجه سانتی گراد نگهداری شد .جهت تهیه دوز تلقیح باکتری از کشت دوم به داخل محیط آبگوشت BHI برده و در دمای۳۷ درجه سانتی گراد ب مدت 18 ساعت گرم خانه گذاری شد. سپس از کشت اول کشت مجددی داده شد و در دمای37 درجه سانتی گراد به مدت 18 ساعت گرم خانه گذاری شد. ازکشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله کووتی که حاوی ۴ میلی لیتر آبگوشت BHI استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری 0/1 در طول موج 600 نانومتر به دست آید. سپس با انتقال 1 میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، ب لوله حاوی 9 میلی لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد رقت های متوالی تا 6 تهیه شد . از طریق انتقال 100 میکرولیتر از هر رقت به پلیت های

حاوی BHI آگار از رقت های تهیه شده، کشت داده شد. پلیت ها به مدت 24 ساعت در دمای 35 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد و پس از این مدت، تعداد باکتری شمارش شد و از این طریق میانگین تعداد باکتریی در کووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ با دو بار تکرار محاسبه شد .با مشخص شدن این عدد هر گاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می توان از این سوسپانسیون غلظت های دلخواه را تهیه نمود .البته در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت هم زمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه شد.

## اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنلی عصاره ها

اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنلی عصاره های اتانولی، متانولی وهیدروالکلی و آبی برگ گیاه اسفناج براساس منحنی استاندارد اسید گالیک طبق روش استویلوا و همکاران ( 2007 ) انجام شد. ابتدا محلول های استاندارد از عصاره های متانولی، اتانولی، هیدروالکلی و آبی برگ گیاه اسفناج به طور جداگانه با ۲ ml معرف فولین سیوکالتو ۲ مولار ترکیب شد و به مدت ۵ دقیقه در محیط ازمایشگاه قرار داده شد سپس به هر کدام از عصاره ها ۱/۶ میلی لیتر کربنات سدیم(Na2Co3)( ۷/۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) اضافه گردیدو همه نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت . بعداز حمام آب گرم میزان جذب آن در طول موج ۷۶۵ nm در اسپکتوفتومتر خوانده شد و ازروی معادله منحنی استاندارد برای اسید گالیک به عنوان استاندارد میزان کل ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره تعیین گردید. آزمایش ها در 3 تکرار انجام و میانگین آنها گزارش شد.

## تعیین کل محتویات فلاونوییدی

برای تعیین محتویات فلاونوییدی ابتدا از هر کدام از عصاره ها ی اتانولی، متانولی، هیدروالکلی و آبی محلول ۱۰ ٪ تهیه شد و بعداز ان از هر محلول ۰/۴ میلی لیتر در لوله ازمایش تمیز و خشک ریخته شد سپس به هر کدام از لوله ها ۱۵۰ ماکرولیتر نیتریت سدیم (NaNo2) ۵٪ اضافه شد و برای ۵ دقیقه در دمای ازمایشگاه ماند. پس از ان به هر لوله ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید (AlCl3) ۱۰٪ اضافه شد و به مدت ۶ دقیقه دور از نور و در تاریکی قرار گرفت. بعداز طی دوره تاریکی به هر لوله ۱ میلی لیتر سود سوزآور (NaOH) ۱ مولار اضافه گردید و سپس ۱/۲ ملی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. بعداز ان جذب تمام نمونه ها در اسپکتوفتومتر با طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد و نتایج برحسب منحنی استاندارد کویرستین و بر اساس میلی گرم کویرستین در گرم اعلام شد. (Chang C و همکاران ۲۰۰۲)

## ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره های برگ گیاه اسفناج با بررسی قدرت رادیکال گیرندگی (DPPH)

برای اندازه گیری خواص آنتی اکسیدانی ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف و به صورت افزایشی از هر عصاره به ۵ میلی لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد ازDPPH اضافه گردید و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه دردمای اتاق و در تاریکی جذب نوری آنها را با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومترخوانده شد. و با استفاده از فرمول زیر درصد مهار رادیکالی غلظت ها (I%) محاسبه و سپس با استفاده از منحنی خط در نرم افزار اکسل غلظت مهار کننده ۵۰ درصد رادیکالی ($IC_{50}$) برمبنای میکروگرم در میلی لیتر حاصل گردید (کامکار و همکاران ۱۳۹۰)

فرمول محاسبه میزان درصد مهار رادیکالی

$$I\% = (Ablank- Asample /Ablank) \times 100 )$$

## تعیین حداقل غلظت بازدارندگی ( Minimum Inhibitory Concentratin)

جهت تعیین حداقل غلطت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن از پلیت ۹۶ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. غلظت های متوالی از عصاره های مختلف الکلی و آبی اسفناج در آبگوشت BHI حاوی

۵ درصد DMSO تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره ها به هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه انتقال داده شد و تا ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری نیز اضافه شد. (با غلظت نهایی $5\times10^5$ CFU/mlباکتری در هر چاهک) که با تهیه رقت های متوالی از سوسپانسیون باکتری و کشت در پلیت و شمارش تعداد کلونی تأیید گردید. محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به شیکر مخلوط سپس جذب نوری با استفاده از Plate Reader در زمان صفر با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند و بعد از اتمام گرم خانه گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک ها به صورت چشمی مشاهده گردید د و با جذب نوری خوانده شده بعد از گرم خانه گذاری توسط Plate Reader تایید شد. روش کار بدین صورت بود که افزایش جذب نوری به میزان بزرگتر یا مساوی ۰/۱ نسبت به زمان صفر به معنای رشد باکتری و ایجاد کدورت و اولین غلظت تکی یا ترکیبی از عصاره ها که فاقد کدورت بودند به منزله حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) در نظر گرفته شدند.(Schwalbe و همکاران ۲۰۰۷)

### تعیین حداقل غلظت کشندگی ( Minimum Bacteriocidal Concentration)

مقدار 10 میکرولیتر از هر یک از میکروپلیت هایی که کدورت آنها از کدورت ستون آخر کمتر بود و یا به عبارتی باکتری در آن رشد نکرده بود را روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح و کشت داده و پس از 24 ساعت گرمخانه گذاری در دمای 37 درجه، پلیت ها از نظر رشد باکتری بررسی گردید و غلظت عصاره که حداقل۹۹/۹ درصد از سلول های میکروبی را کاهش می دهد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.(نصیری پور و همکاران ۲۰۱۴)

تمام اندازه گیری ها سه بار تکرار گردید و مقادیر به صورت میانگین همراه با انحراف معیار گزارش شدند . داده های جمع آوری شده با نرم افزارSPSS و آزمون های آماری آنا لیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

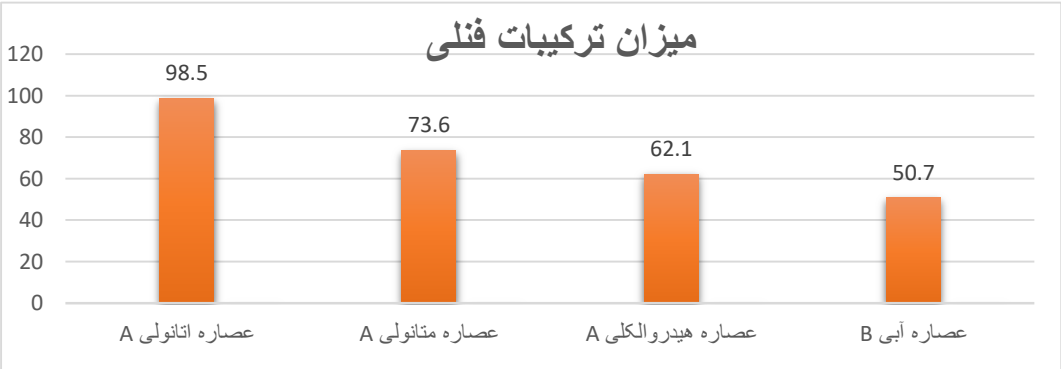
## نتایج

### ۱- نتایج شیمیایی

### میزان کل ترکیبات فنلی عصاره های متانولی و اتانولی هیدروالکلی و آبی برگ گیاه اسفناج

در پژوهش حاضر عصاره های مختلف گیاه اسفناج به عنوان یک منبع طبیعی آنتی اکسیدانی، به روش ماسراسیون استخراج و میزان کل ترکیبات فنلی آن مورد ارزیابی قرار گرفت .طبق نتایج آنالیز واریانس مشخص شد در نوع استخراج با حلال های متانول ، اتانول، هیدروالکلی و آبی با توجه به تغییرنوع حلال عصاره گیاه اسفناج تاثیر معنی داری بر میزان ترکیبات پلی فنلی اندازه گیری شده داشت($p<0/05$). نتایج اندازه گیری مقدار ترکیبات پلی فنلی موجود در عصاره های متانولی و اتانولی، هیدروالکلی و آبی این گیاه به صورت میانگین در (نمودار 1)نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود با تغییر نوع حلال میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره تغییر یافت. طبق نتایج با تغییر نوع حلال از غیر قطبی به سمت قطبی میزان ترکیبات فنلی استخراج شده به شکل معناداری کاهش یافته است . (استویلوا و همکاران 2007)

نمودار ۱ _میزان کل ترکیبات فنلی عصاره های متانولی و اتانولی هیدروالکلی و آبی برگ گیاه اسفناج

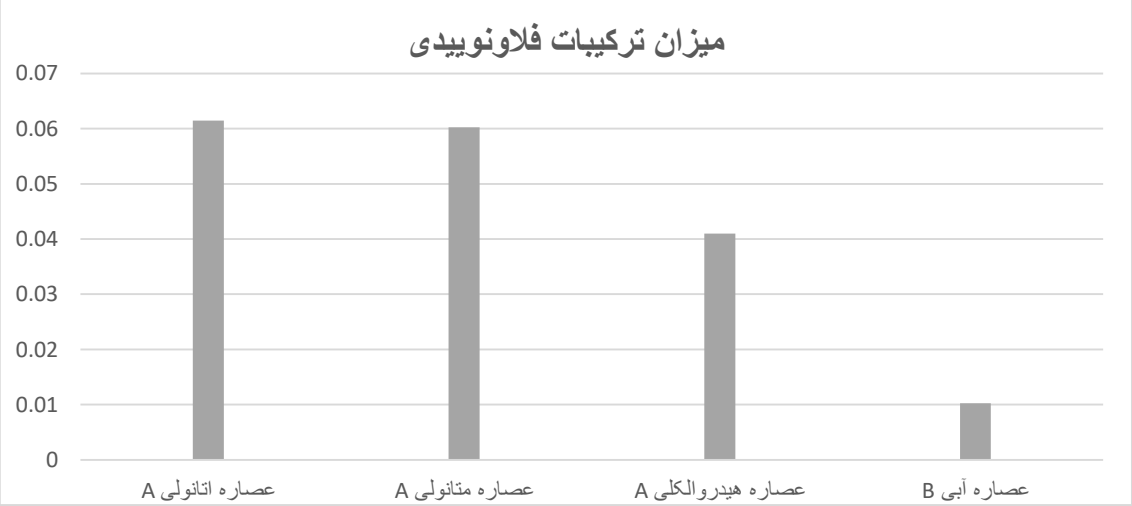


*مقادیر ترکیبات فنلی عصاره های متانولی و اتانول، هیدروالکلی و آبی اسفناج برحسب mg اسید گالیک در صد گرم بیان شده است.
*داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار آمده است و داده های با حروف لاتین متفاوت با هم اختلاف معنی دار دارند ( $p<0/05$).

## میزان ترکیبات فلاونوئیدی عصاره های اتانولی و متانولی و هیدروالکلی و آبی اسفناج

میزان تام ترکیبات فلاونوئیدی عصاره های مختلف اسفناج به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه گیری شد .پس از قرار دادن میزان جذب عصاره اسفناج در معادله خط منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه میزان ترکیبات فلاونوئیدی صورت گرفت. با توجه به جذب های به دست امده برای هر عصاره میزان ترکیبات فلاونوئیدی در (نمودار۲) امده است. با توجه به نمودار مد نظر میزان ترکیبات فلاونوئیدی برای عصاره های الکلی به شکل معنا داری بیشتر از عصاره ابی میباشد و این ازمایش هم تایید میکند که نوع حلال مورد استفاده برای فرایند عصاره گیری تاثیر بسیاری بر استخراج مواد موثره دارد (Chang C و همکاران ۲۰۰۲)

نمودار ۲_ میزان ترکیبات فلاونویدی عصاره های اتانولی و متانولی و هیدروالکلی و آبی اسفناج




*مقادیر ترکیبات فلاونوییدی عصاره های متانولی و اتانول، هیدروالکلی و آبی اسفناج بر حسب mg کوئرستین در صد گرم می باشد .
*داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار آمده است و داده های با حروف لاتین متفاوت با هم اختلاف معنی دار دارند . ($p<0/05$)

## ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی و اتانولی، هیدروالکلی و آبی

در این تحقیق قدرت مهار رادیکال های آزاد و همچنین توانایی بازداری اکسیداسیون توسط عصاره های اتانولی، متانولی، هیدروالکلی و آبی گیاه اسفناج مورد بررسی قرار گرفت .توانایی مهار رادیکال آزاد توسط ازمایش 2 و 2- دی فنیل-1 -پیکریل هیدرازیل یا DPPH ارزیابی شد. در این آزمایش با تغییر نوع حلال مورد استفاده، مهار رادیکال ها با قدرت بیشتری صورت گرفت. غلظتی از عصاره ها که 50 درصد مهار رادیکالی (IC50) را سبب می شوند در جدول شماره 1 در مقایسه با بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن آورده شده است .مقدارIC50 عصاره اتانولی5 ±۱۳۵میکروگرم بر میلی لیتر ، عصاره متانولی ۲۲۵±2 میکروگرم بر میلی لیتر ، عصاره هیدروالکلی 152±1/5 میکروگرم بر میلی لیتر و عصاره آبی

12±۲۰۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در این آزمایش ها BHT به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد، مقدار IC50 بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن ۰/۲۵±۴/۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود .قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ها ی مختلف در این تست نسبت به ، آنتی اکسیدان سنتزی BHT ضعیف تر بود (p<0/ 05) در این ارتباط اثرات ضد رادیکالی عصاره های مختلف الکلی با یکدیگر اختلاف معنی دار نداشت اما با عصاره آبی اسفناج اختلاف معنی داری داشت(p<0/ 05) و این آزمایش مشخص کرد که عصاره آبی اسفناج نسبت به عصاره های الکلی دارای خواص انتی اکسیدانی کمتری میباشد و از این نظر ضعیف تر میباشد. (کامکار و همکاران ۱۳۹۰)

جدول شماره ۱- اثر عصاره های اتانولی، متانولی، هیدروالکلی و آبی اسفناج و کنترل مثبت در مهار رادیکال آزاد DPPH

| نمونه | DPPH. IC50 (µg/ml) |
|---|---|
| عصاره اتانولی | ۱۳۵± 5[a] |
| عصاره متانولی | ۲۲۵±2a |
| عصاره هیدروالکلی | ۱۵2±1/5a |
| عصاره آبی | ۲۰۱۱±12b |
| BHT | ۴/۹±0/25c |

*داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بدست آمده است وداده های با حروف لاتین متفاوت با هم اختلاف معنی دار دارند. (p<0/05 ).

## ۲- نتایج میکروبی

نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) برای عصاره های مختلف اسفناج با روش میکرودایلوشن در این پژوهش با سه تکرار در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ -حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی ،متانولی ، هیدروالکلی و آبی اسفناج روی باکتری های مورد آزمون

| نوع عصاره / باکتری های آزمون | استافیلوکوکوس اورئوس | اشرشیا کلی |
|---|---|---|
| عصاره اتانولی | 11479 ppm a | 12467 ppm a |
| عصاره متانولی | 16304 ppm a | 17338 ppm a |
| عصاره هیدروالکلی | 13305 ppm a | 14589 ppm a |
| عصاره آبی | 52380 ppm b | 64298 ppm b |
| عصاره اتانولی | 11479 ppm a | 12467 ppm a |

*داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بدست آمده است داده های با حروف لاتین متفاوت با هم اختلاف معنی دار دارند .( p<0/05)

جهت تعیین نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) طبق آزمون های انجام شده در این پژوهش با سه تکرار، عصاره های اتانولی ، متانولی ، هیدروالکلی وآبی اسفناج دارای خاصیت کشندگی چشمگیری نبودند .این احتمال وجود دارد که عصاره آبی در غلظت های بالاتر از ۶۰۷۵۰ ppm و همچنین عصاره اتانولی و متانولی و هیدروالکلی تقریبا در یک محدوده بودند و در غلظت های بالاتر از ۳۸۹۵۰ ppm خاصیت کشندگی داشته باشند. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بدست آمده است.

## بحث

اسفناج دارای مقدار قابل توجهی مواد مغذی ضروری از جمله پتاسیم، کلسیم، منیزیم، فسفر، آهن، مس، روی، پروتئین، فیبر، ترکیبات فنولی و اسیدهای چرب ضروری غیر اشباع به مقدار 66 درصد از جمله اسید لینولنیک و اسید لینولئیک، پالمیتولئیک، هگزادکاتریدیونیک، اسید استئاریک، وهمچنین به مقدار زیادی فلاونوئیدها وترپن ها می باشد(عرفانی و همکاران ۲۰۰۶) یائو وهمکاران در سال ۲۰۰۷ به وسیله حلالهای با قطبیت های متفاوت (استون، اتانول، متانول)عصاره دانه های جو را استخراج کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که بالاترین راندمان عصاره گیری مربوط به عصاره متانولی است. قربانی و همکاران در پژوهشی دیگردر سال ۲۰۱۲ اثرحلالهای مختلف (آب، استون، اتانول و هگزان) برراندمان استخراج، محتوای فنلی کل و فعالیت ضد اکسایشی عصاره غلاف نخود فرنگی مورد بررسی قرارگرفته است .نتایج نشان داد بیشترین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت ضد اکسایشی مربوط به عصاره استخراج شده با حلال اتانول بود. درپژوهشی که توسط جیوانی وهمکاران درسال ۲۰۱۱ بر روی گیاه *EtlingeraelatiorJack* انجام گرفت، اثرات حلالهای آلی متانول، استون و آب بر میزان ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی ارزیابی شد، اختلاف معنی داری بین نتایج به دلیل نوع حلال به کار رفته و ویژگی ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود درگیاه گزارش شد. که در این مطالعه هم حلال های آلی ترکیبات فنلی و فلاونوییدی بیشتر را استخراج کرده بودند. کالیشراکا و همکاران (۱۹۹۵) تحقیقی بر روی اثر حلالهای مختلف بر استخراج ترکیبات فنلی هسته انگور از حلال های آب، متانول خالص، اتانول 75 درصد انجام دادند. نتایج شناسایی ترکیبات با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد که متانول به عنوان بهترین حلال برای استخراج کاتچین و اتانول 75 درصد سبب استخراج حداکثری مقادیر ترکیبات فنلی گردید. با توجه به مطالعات انجام شده میزان خواصیت انتی اکسیدانی بستگی بسیار زیادی به ترکیبات فنولی دارد و هرچه این ترکیبات بیشتر باشد میزان فعالیت انتی اکسیدانی هم بیشتر میباشد و همچنین میزان خروج ترکیبات فنلی و فلاونوییدی با تغییر نوع حلال مورد استفاده تغییر میکند با توجه به این پژوهش انجام شده میزان خروج ترکیبات فنولی با تغییر نوع حلال مورد استفاده برای فرایند عصاره گیری تغییر میکند و زمانی که از حلال های الکلی استفاده میشود میزان ترکیبات فنولی بیشتری خارج میشود و در نتیجه خاصیت انتی اکسیدانی هم بیشتر میشود که این با مطالعه انجام شده در این تحقیق برای گیاه اسفناج کاملا همخوانی دارد و تایید میکند که برای استفاده بهتر از ترکیبات فنلی و انتی اکسیدانی عصاره های گیاهی اسفناج بهتر است از حلال های آلی در استخراج عصاره استفاده بشود. در ادامه صحبت به بررسی نتایج میکروبی و تاثیر آن میپردازد انسان از سال ها پیش از گیاهان دارویی در پزشکی و یا به عنوان ادویه در مواد غذایی استفاده می کرد اما از قرن نوزدهم میلادی به تدریج ترکیبات شیمیایی، جا یگزین داروها و افزودنی های گیاهی شدند. با این وجود، امروزه با افزایش سطح آگاهی و نگرانی های موجود پیرامون عوارض جانبی این ترکیبات شیمیایی و ایجاد مقاومت ها ی دارویی ، نگرش جدیدی نسبت به استفاده از نگهدارنده های طبیعی بخصوص گیاهان دارویی در مواد غذایی ایجاد شده است و تمایل به مصرف محصولات فاقد نگه دارنده و یا با نگه دارنده های طبیعی رو به افزایش است. از جمله ای نگهدارنده ها می توان به عصاره های گیاهی اشاره نمود .عصاره های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن ها دارای اثرات شناخت شده ضد باکتریایی می باشند.( Alpsoy L ۲۰۱۰) به طور کلی عصاره های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن ها طیف وسیعی از فعالیت های زیستی مانند فعالیت های ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی و فعالیت های دیگر را از خود نشان می دهند .با توجه به نقش مهمی که گیاهان دارویی در درمان برخی بیماری های عفونی ایفا می کنند استفاده از انها بسیار رایج

گشته است. (حجتی بناب و نیکخواه ۱۳۸۹) Parekh و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه ای که روی 34 گونه گیاهان دارویی در هند و تاثیر آن بر سه گونه مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام دادند، مشخص شد که خاصیت ضدباکتریایی برای عصاره های الکلی بیش از عصاره های آبی برای تمام گیاهان می باشد. در سال ۲۰۱۱ پژوهش دیگری انجام شد و مشخص شد که فلاونوئید، استروئید و CHO در عصاره آبی اسفناج و فنول، ساپونین، تانین، آمینواسید و CHO عصاره الکلی آن وجود دارد آنها نشان دادند که عصاره الکلی اسفناج مواد موثره بیشتری از گیاه را در خود حل می کند .بنابراین عصاره الکی خاصیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره آبی دارد. (Evajelene, V ۲۰۱۱) بر اساس گزارش هوسان نسیم و همکاران در سال ۲۰۱۲ عصاره آبی اسفناج تازه تاثیر بازدارندگی کمی بر رشد *پروتئوس ولگاریس* ، *میکروکوکوس لوتئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* داشت و عصاره آبی اسفناج کهنه هیچ تاثیری بر رشد *سالمونلا تایفی موریوم* ، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* نداشت .همچنین عصاره آبی برگ اسفناج تازه و کهنه اثر بازدارندگی ناچیزی بر *اشرشیا کلی* داشت. همچنین این محققان نشان دادند که عصاره اتانولی برگ اسفناج تازه به روش انتشار دیسک به طور قابل توجهی از رشد *سالمونلا تایفی موریوم* جلوگیری می کند قدرت بازدارندگی عصاره اتانولی اسفناج تازه بر سایر پاتوژن های پستانداران بسیار شاخص است. در مطالعه انجام شده توسط Dubey در سال 2010 که با روش انتشار دیسک انجام شد، حساسترین باکتری نسبت به عصاره اسفناج *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین قطر هاله مربوط به *باسیلوس سابتیلیس* بود .آنها مقدار درصد خالص گلیکولیپید در عصاره آبی و متانولی را بررسی و به این نتیجه رسیدند که مقدار گلیکولیپید و گلیسرولیپید در عصاره متانولی اسفناج بیشتر ازعصاره آبی است همچنین تانن خام جداسازی شده از عصاره متانولی آن بیشتر می باشد. بر اساس پژوهش انجام شده توسط Avatoو همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی عصاره گیاه هایپرفورین (Hyperforin) مشخص شد که این عصاره بر باکتری های گرم مثبت اثر ضد میکروبی مؤثرتری داشته است . مؤثرتر بودن عصاره گیاهی علف چای بر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی در گزارشات دیگر نیز آمده است. با توجه به مطالعات گذشته، در این مطالعه نیز اثر عصاره های مختلف اسفناج بر روی باکتری های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد و میزان MIC و MBC تعیین شد. نتیجه گیری کلی بر اساس نتایج حاصل در این پژوهشنشان میدهد که عصاره آبی اسفناج در روش براث میکرودایلوشن، اثر بازدارندگی کمی روی *اشرشیا کلی* داشت اما روی *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر بازدارندگی بیشتری از خود نشان داد .با توجه به نتایج به دست امده در این پژوهش تاثیر ضد باکتریایی عصاره ها در هر دو حالت الکلی و غیر الکلی روی باکتری گرم مثبت ازمون بیشتراز باکتری گرم منفی میباشد که علت این فرایند ناشی از وجود غشای خارجی دور دیواره سلولی در باکتری ها ی گرم منفی است که نفوذ و انتشار ترکیبات هیدروفوبیک در پوشش لیپو پلی ساکاریدی باکتری را محدود می نماید عصاره های الکلی نیز در روش براث میکرودایلوشن روی هردو میکروارگانیسم اثر بازدارندگی نسبتا یکسانی را نشان داد و طبق نتایج بیشترین اثر مهارکنندگی روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید .درپژوهش پیش رو عصاره الکلی اسفناج احتمالا به علت حضور مقادیر بیشتر گلیسرولیپید و گلیکولیپید و ترکیبات فنلی و فلاونوویدی بیشتر خاصیت ضد باکتریایی قوی تری نسبت به عصاره آبی داشت. در نهایت می توان نتیجه گیری کرد وجود ترکیبات فلاونوئیدی و ترپن ها، اسید های چرب غیر اشباع و مواد معدنی با درصد بالا یکی از مهمترین عوامل بازدارندگی بیشتر اسفناج روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد .در نتیجه این عصاره می تواند به عنوان یک نگهدارنده و آنتی بیوتیک طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از سرکار خانم منصوره کنعانی مسئول آزمایشگاه شیمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان و سرکار خانم تعقلی مسئول آزمایشگاه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان که ما را از راهنمایی های ارزنده خویش بهره مند ساختند و در انجام آزمایشات بسیار به ما کمک موثر کردند تقدیر و تشکر میگردد.

**Nemat Shahi**, M. M. 2016. Investigating the antioxidant and antimicrobial properties and identifying the chemical compounds of extracts from different parts of Bongardia plant and evaluating the possibility of using it (chrysogonum to increase the oxidative stability of sunflower oil), specialized doctoral thesis, Department of Science and Industry Food, Islamic Free University, Sabzvar branch.(In Persian)

**Hojjati Banab**, Z.; Nikkhah, A. 1389. Investigating the antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of cottage cheese and henna on some intestinal bacteria. Journal of the World of Microbes. 3) 186-193. (In Persian)

**Salmanian**, Sadeghi Mahonek, Elami, Mehran, Ghorbani, & Mohammad. (2014). Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds and antibacterial and antioxidant activity of oleic fruit acetone extract. Scientific Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, **13(1)**, 53-66. (In Persian)

**Kamkar Abolfazl**, Shariati Far Nabi, Jamshidi Amir Hossein, Jabali Javan Ashkan, Sadeghi Tanaz, & Zaigham Monfared Mohammad Mehdi. Studying the antioxidant activity of essential oil and extract of Iranian mint (Mentha longifolia) in laboratory conditions. (In Persian)

**Sun**, T., and Ho, H. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food Chemistry, **90**:743–749

**Singh**, J., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2018). Extraction, identification, and potential health benefits of spinach flavonoids: a review. *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*, **107**-136

**Javan**, A. Jebelli. "Combinational effects of Trachyspermum ammi and Zataria multiflora Boiss essential oils on some pathogenic food-borne bacteria." (2016): 20163008693.

**Nasirpour**, M., Yavarmanesh, M. and Mohamadisani, A. 2014. Antibacterial effect of agueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. Tehran, Journal of food sciences. **46**: 12.73-84. (In persian)

**Schwalbe** R, Steele-moore L, Goodwin AC. 2007. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, CRC Press, New York

**Bahramiyan**, F., Ghiassi Tarzi, B.,Yaghmaei, S. and Bahonar, A. 2012.Extraction of plum phenolic CompoundsUsing Different solvents, The AntimicrobialEffect of the Extracts on the growth of E.coli and S aureus. *Food Technology &Nutrition*. **1(9)**: 73-80.

**Ahmad**, I., and Aqil, F. 2007. In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. Microbial J, **162**: 5. 264-275.

**Erfani**, F. and hasandokht, M. 2006. Determination and comparison of some nutrients in seven Iranian spinach.Tehran, Journal of food sciences. **27**: 1. 2733. (In persian)
**Evajelene**, V. and Nataragan, D. 2011. Evaluation of free radical sca venging activity and biological properties of *spinacia oleracea* L. Ijest Journal. **3**: 1. 25-30
**Dubey**, A., Mishra, N., and Singh, N. 2010. Antimicrobial activity some selected vegetables. International. applied biology and pharmaceutical technology J. **3**: 1. 994-999.
**Hogo**, W., 1980. Eros Pharmaceutical Sciences, Dr.fazli. translater, Publication Mashhad University of Medical Sciences, pp: **320**-344.
**Parekh**, J., Gedega, D., and Chanda, S. 2007. Antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of 34 indian medicinal plants against some *staphylococcus species*. Turkish Biology Journal. **32**: 3. 63-71
**Issazadeh**, A., M. Yavarmanesh, and SANI A. MOHAMMADI. "Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts from Spinacia oleracea L.(varieties mashhad) on bacterial indicators." (2017): **91**-106.
**Alami**, M., and M. Ghorbani. "Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds, antibacterial and antioxidant activity of hawthorn (Crataegus Elbursensis) fruit acetonic extract." Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 13.1 (2014): **53**-66.
**Adibfard**, A., Mirzaie, A., Hajihossini, R., Sadeghi, H., Sharifi, B., & Mohammadi, R. (2012). Evaluation of Antioxidant Properties of Vegetables Consumed in Yasuj, Iran.
Nemat, Shahi Mohammad Mehdi, et al. "Study of Antioxidant Properties and Recognition of Chemical Compounds of Extracts from Adiantum Capillus-veneris Leaf." (2021): **15**-29.
**Jebelli Javan**, Ashkan, et al. "Antioxidant and antimicrobial effects of different mints, the most widely used in Caspian Sea areas, Iran." Journal of Veterinary Laboratory Research 6.2 (2014): **93**-102.
**Olagoke**, O. "Phytochemical analysis and antibacterial activities of spinach leaf." Am. J. Phytomed. Clin. Ther 6 (2018): **8**.
**Dillard** CG, German GB. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. J Sci Food Agric۲۰۰۰
۱۷۴۴-۱۷۵۶ :۸۰
**Maganha** EG, Halmenschlager RC, Rosa RM, Henriques JA, Ramos AL, Saffi J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus Food Chem 2010; **118(1)**: 1-10..
**Shyamala** BN, Sheetal Gupta A, Jyothi L, Jamuna P. Leafy vegetable extracts—antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2005; **2(6)**:239-245
**Alpsoy** L. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr J Biotechnol 2010; 2474-2481.

**Chang C**, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Food and Drug Analysis* 2002; **10**: 178-82.