

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی

پاییز ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره دوم، صفحه ۴۳ - ۳۷

اثر ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال (*Citrus sinensis*) علیه ایزوله های کلینیکی هلیکوباکتر پیلوری در شرایط آزمایشگاهی

محبوبه نخعی مقدم

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی - واحد مشهد
نویسنده مسئول: دکتر محبوبه نخعی مقدم، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی - واحد مشهد.
mahboobe_nak@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۴/۲۸ پذیرش: ۸۸/۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه عفونت هلیکوباکتر پیلوری با ترکیبی از عوامل آنتی بیوتیکی درمان می شود، اما گاهی درمان کامل نبوده و یا اثرات جانبی داروها مشاهده می شود. از پوست پرتقال به عنوان افزودنی طعم دهنده در بعضی از مواد غذایی مثل برنج و کیک استفاده می شود. با توجه به گزارشات مبنی بر اثرات پوست پرتقال بر ناراحتی های گوارشی در طب سنتی و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی هلیکوباکتر پیلوری، هدف این تحقیق بررسی اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره متانولی پوست پرتقال بوده است.

روش بررسی: بعد از جمع آوری پوست پرتقال و شناسایی، عصاره ی متانولی آن با روش پرکولاسیون تهیه و اثر آن علیه ۳۷ ایزوله کلینیکی هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش دیسک دیفیوژیون، در محیط مولر هینتون آگار حاوی امولسیون زرده تخم مرغ در مقایسه با آموکسی سیلین و مترونیدازول بررسی شد.

یافته ها: تمامی ایزوله ها نسبت به دیسک حاوی ۲mg عصاره حساس بودند. میانگین قطر هاله ی عدم رشد $13/28 \pm 0/45$ میلی متر بود. حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) عصاره $729 \mu\text{g/ml}$ بود. حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره بالاتر از MIC آن بود. فعالیت ضد باکتریایی عصاره بعد از حرارت دادن در دمای اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه حفظ شد.

نتیجه گیری: تحقیق در مورد محصولات طبیعی که مصرف آن ها در طب سنتی برای ناراحتی های گوارشی مرسوم است، از نظر فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری با ارزش می باشد. در این پژوهش مشخص گردید پوست پرتقال رشد این باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار می کند. با توجه به سایر منافع پوست پرتقال مصرف آن در تهیه ی مواد غذایی بویژه کیک بجای وانیل توصیه می شود.
واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، عصاره، پوست پرتقال.

مقدمه

آدنوکارسینومای معده می شود (۱). از آن جایی که این باکتری امروزه شایع ترین عامل بیماری معده محسوب می شود و باعث سرطان معده می شود، درمان و ریشه کنی

هلیکوباکتر پیلوری باعث اختلالاتی مثل سوء هاضمه، گاستریت مزمن، زخم معده، زخم اثنی عشر و

کمک دستگاه تقطیر دوار، عصاره غلیظ و سپس روی بن ماری با استفاده از دمای 45°C ، حلال کاملاً حذف شد و عصاره ای غلیظ و تقریباً خشک بدست آمد.

جداسازی سویه های هلیکوباکتر پیلوری: به

دنبال پیگیری های انجام شده، سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری موجود نبود و برای همین از ایزوله های کلینیکی آن استفاده شد. ۳۷ ایزوله هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی معده روی محیط بروسلا آگار حاوی ۷-۵٪ خون اسب تازه، ۱٪ نشاسته، ۵mg/l ونکومایسین، ۵mg/l تری متسوپریم، ۱۰mg/l آمفوتریسین B و ۲۵۰۰u/l پلی میکسین B، در شرایط میکروانروفیل 37°C حاوی CO_2 و رطوبت به مدت ۷-۵ روز جدا شدند. باکتری های جدا شده با استفاده از رنگ آمیزی گرم، آزمایش های اوره آز، کاتالاز، اکسیداز مثبت و آزمایش عدم تولید H_2S در محیط TSI آگار، آزمایش عدم تولید اندول در محیط SIM آگار و مقاومت به نالیدیکسیک اسید شناسایی شدند (۱۲).

آماده سازی دیسک های آغشته به عصاره: ۱

گرم از عصاره خشک و تغلیظ شده در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل، داخل مزور حل و غلظت ۰/۱g/ml عصاره آماده شد. پس از خواندن دقیق حجم سوسپانسیون، تعداد معینی دیسک بلانک استریل داخل مزور قرار داده شد. دیسک ها مدت ۳۰ دقیقه داخل محلول عصاره قرار داشتند تا عصاره به خوبی جذب دیسک ها شود. سپس در شرایط استریل دیسک ها خارج و داخل پلیت استریل گذاشته شدند. با قرائت حجم باقی مانده محلول و محاسبه کاهش حجم، مقدار عصاره جذب شده توسط هر دیسک، ۰/۰۲ میلی لیتر بدست آمد که با یک تناسب مقدار عصاره در هر دیسک ۲ میلی گرم تعیین شد.

بررسی اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره ها:

فعالیت عصاره علیه ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از آزمایش انتشار در آگار (DDM) روی محیط مولر هینتون آگار حاوی امولسیون زرده تخم مرغ (EYE آگار) بررسی شد. ۱۰۰ میلی لیتر محیط، حاوی ۳/۸ گرم مولر هینتون آگار، ۱۰-۷٪ امولسیون زرده تخم مرغ و ۴mg تری فنیل تترازولیوم کلرید است (۸). پس از تهیه دیسک های حاوی ۲mg عصاره، فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره روی محیط EYE آگار تلقیح شده با سوسپانسیون باکتریایی دارای کدورت معادل لوله

آن اهمیت زیادی دارد. برای درمان عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری از روش های درمان ترکیبی استفاده می شود (۲)، اما درمان همیشه موفق نیست و باعث ریشه کنی عفونت نمی شود (۳) و یا گاهی نیز اثرات جانبی داروها مشاهده می شود. از این رو تلاش برای شناسایی منابع درمانی جدید از اهمیت خاصی برخوردار است که یکی از این منابع گیاهان دارویی است. تعیین اثرات ضد هلیکوباکتر پیلوری چاشنی ها و گیاهان مورد استفاده در طب سنتی می تواند گامی موثر در جهت معرفی عصاره یا مواد خالص گیاهی برای همراه کردن و یا جایگزین کردن آن ها با داروهای شیمیایی و سنتزی باشد. تاکنون فعالیت ضد باکتریایی چندین عصاره گیاهی علیه هلیکوباکتر پیلوری بررسی شده است (۹-۴). پرتقال گیاهی درختی و از تیره نارنج (*Rutaceae*) است که در نواحی مختلف شمال و جنوب ایران پرورش می یابد. پرتقال مقاومت طبیعی بدن را زیاد می کند. اثر مدر، ملین و رقیق کننده خون دارد. در کم خونی و درمان سوء هضم مؤثر واقع می شود. در رفع التهاب مخاط لثه و دهان تأثیر دارد. الکتور پوست پرتقال برای معطر ساختن شربت ها، لوسین ها و لیمونادها استفاده می شود (۱۰). از نظر دارویی پرتقال برای درمان سرما خوردگی، تب، اختلالات کبدی، مشکلات کیسه صفرا، روماتیسم، شوک روحی، صرع، ناراحتی های گوارشی و لکه های پوستی استفاده می شود (۱۱). همچنین پوست پرتقال به عنوان افزودنی طعم دهنده در بعضی از مواد غذایی مثل کیک و یا در تهیه پلو مورد استفاده قرار می گیرد. از آن جایی که پوست پرتقال به طور سنتی در ناراحتی های گوارشی مصرف دارد و مقاومت هلیکوباکتر پیلوری نسبت به آنتی بیوتیک های رایج برای درمان رو به افزایش است، هدف این تحقیق بررسی اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره متانولی پوست پرتقال بوده است.

روش بررسی

تهیه عصاره متانولی گیاه: پوست پرتقال *Citrus sinensis*) تامسون از شمال کشور تهیه و شسته شد. سپس در سایه و دور از آفتاب خشک و عصاره ی متانولی (متانول خالص) آن با روش پرکولاسیون تهیه شد. با

هر گروه حساب شد و برای بررسی اختلاف بین جفت میانگین از آزمون t استفاده شد. نتایج با $P < 0.01$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته ها

تمامی ایزوله ها نسبت به دیسک حاوی ۲mg عصاره حساس بودند. میانگین قطر هاله ی عدم رشد $13/28 \pm 0/45$ میلی متر بود. مطابق با جدول ۱ قطر هاله ی عدم رشد عصاره متانولی پوست پرتقال (با غلظت ۲mg/disc) بین باکتری های مورد آزمایش، برای ۱۷ ایزوله (۵۱/۵۱٪) بیشتر از دیسک مترونیدازول (۵μg/disc) بود، درحالی که قطر هاله عدم رشد دیسک آموکسی سیلین (۲۵μg/disc) برای تمامی ایزوله های آزمایش شده بیشتر از عصاره متانولی پوست پرتقال (۲mg/disc) بود. بیشترین میانگین قطر هاله ی عدم رشد برای عصاره ۲۲ میلی متر بود. از نظر آماری اثر آموکسی سیلین (با میانگین قطر هاله ی عدم رشد $1/77 \pm 35/56$ میلی متر) به طور معنی داری بیشتر از عصاره ی متانولی پوست پرتقال ($13/28 \pm 0/45$ میلی متر) بود ($P < 0.01$).

حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) عصاره $729 \mu\text{g/ml}$ بود (جدول ۲). حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره بالاتر از MIC ($1041/5 \mu\text{g/ml}$) بود و عصاره اثر باکتریواستاتیک داشت. فعالیت ضد باکتریایی عصاره بعد از حرارت دادن در دمای اتوکلاو به مدت ۳۰ دقیقه (جدول ۳) حفظ شد.

۴ مک فارلند (10^8cfu/ml) مورد آزمایش قرار گرفت (۱۳). از دیسک های حاوی حلال بدون عصاره به عنوان شاهد منفی و از دیسک های استاندارد (Himedia) آموکسی سیلین $25 \mu\text{g}$ و مترونیدازول $5 \mu\text{g}$ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محیط ها به مدت ۳ روز در گرمخانه میکروانروفیل 37°C دارای ۱۰-۱۱٪ گاز کربنیک و ۹۰-۱۰۰٪ رطوبت قرار داده شدند. برای هر عصاره دو دیسک گذاشته شد (۷) و میانگین قطر هاله های عدم رشد (\pm انحراف معیار) برحسب میلی متر گزارش شد.

تعیین MIC و MBC عصاره ها: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) عصاره با استفاده از روش رقت در آگار، برای ۴ ایزوله با حساسیت بیشتر (۴)، تعیین شد. غلظت های مختلف از عصاره (صفر به عنوان شاهد، ۱۵۶، ۳۱۲/۵، ۴۱۶/۵، ۶۲۵، ۸۳۳ و ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) در محیط مذاب مولر هینتون آگار تهیه و با ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی 10^8cfu/ml تلقیح شدند. حداقل غلظت کشنده باکتریایی (MBC) با استفاده از عدم رشد باکتری به دنبال تلقیح مجدد از پلیت های حاوی غلظت های مختلف عصاره به محیط مولر هینتون آگار فاقد عصاره، تعیین گردید (۴).

حساسیت ماده ضد باکتریایی نسبت به درجه حرارت: لوله های حاوی $0/1 \text{g/ml}$ عصاره متانولی در 80°C آون و اتوکلاو به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس آزمایش سنجش فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره روی محیط EYE آگار مشابه روش قبلی برای سه ایزوله در کنار دیسک شاهد انجام شد.

محاسبات آماری: داده ها به صورت میانگین قطر هاله های عدم رشد بعد از دو بار آزمایش برحسب میلی متر گزارش گردید. میانگین \pm انحراف معیار (S.E) برای

جدول ۱ قطر هاله های عدم رشد عصاره متانولی پوست پرتقال علیه ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری با روش انتشار در آگار در مقایسه با دیسک آموکسی سیلین (۲۵μg/disc) و مترونیدازول (۵μg/disc)

ایزوله	عصاره متانولی پوست پرتقال	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) مترونیدازول	آموکسی سیلین
۱	۱۹	۱۳	۲۲
۲	۱۵	۹/۵	۲۸/۵
۳	۱۰	۹	۳۲
۴	۱۷	۱۰	۲۸/۵
۵	۱۷	۲۸	۲۵/۵
۶	۱۳/۵	ND**	۴۰
۷	۱۳	۱۰	۳۳
۸	۹	۱۸	۲۴
۹	۱۲/۵	۶	۲۰
۱۰	۱۱	۴۱/۵	۱۶/۵
۱۱	۱۱	۴۷/۵	۶۰/۵
۱۲	۱۲	ND	۲۵
۱۳	۱۰	۱۱	ND
۱۴	۱۴	۵۰	۲۰
۱۵	۱۱	۴۸/۵	۳۴
۱۶	۹/۵	۶	۵۰
۱۷	۱۲	۱۵/۵	۳۸
۱۸	۲۲	۶	۳۰
۱۹	۱۶	۶	۳۰
۲۰	۱۵	۹/۵	۵۴
۲۱	۱۵/۵	۵۵	۴۰
۲۲	۱۳	۹/۵	۳۵
۲۳	۱۱/۵	۱۰	۳۰
۲۴	۱۴	۲۹/۵	۴۰
۲۵	۱۵/۵	ND	ND
۲۶	۱۴	۵۰/۵	۵۰
۲۷	۱۳	ND	۳۷/۵
۲۸	۱۱	۶۰	۴۲
۲۹	۱۵	۵۰	۳۶
۳۰	۱۱/۵	۶	۴۴
۳۱	۱۵/۵	۱۲	ND
۳۲	۱۲	۹	۴۴
۳۳	۱۱/۵	۲۸	۵۰
۳۴	۱۲	۴۸	۴۰/۵
۳۵	۱۵	۱۱	۲۸
۳۶	۱۰	۱۰	ND
۳۷	۱۲	۱۰	۴۵

* میانگین قطر هاله عدم رشد پس از دوبار آزمایش و با احتساب قطر دیسک (۶ میلی متر) ** تعیین نشده است

جدول ۲ حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد عصاره متانولی پوست پرتقال علیه چهار ایزوله هلیکوباکتر پیلوری با روش رقت در آگار

غلظت (µg/ml)	۱۲۵۰	۸۳۳	۶۲۵	۴۶۸	۳۱۲	۱۵۶	۰ (شاهد)	ایزوله
۱	-	-	-	+	+	+	+	۱
۵	-	-	-	+	+	+	+	۵
۲۵	-	-	+	+	+	+	+	۲۵
۲۹	-	-	+	+	+	+	+	۲۹

جدول ۳ اثر درجه حرارت بر فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره متانولی پوست پرتقال

قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر*			دما	ایزوله
۱۲۱°C (اتوکلاو)	۸۰°C	شاهد		
۱۲/۵	۱۲	۱۱/۵		۵
۱۲	۱۳	۱۲		۶
۱۲	۱۲	۱۱/۵		۸
۱۶	۱۵	۱۵		۲۷

* قطر هر دیسک ۶ میلی متر

میانگین MIC پوست پرتقال ۷۲۹ µg/ml به دست آمد که در این غلظت اثر باکتریواستاتیک داشت. در طب سنتی ایران استفاده از پوست پرتقال در رفع ناراحتی های گوارشی مرسوم است. همچنین از پوست پرتقال برای تهیه بعضی از مواد غذایی استفاده می شود. به عنوان مثال برای خوش طعم کردن کیک به جای وانیل و نیز برای تهیه برنج مخلوط و یا مربا از آن استفاده می شود. اثرات ضد میکروبی پوست پرتقال علیه بعضی از باکتری ها مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *پروتئوس وولگاریس* گزارش شده است (۱۶). در این پژوهش مشخص گردید پوست پرتقال رشد هلیکوباکتر پیلوری را در شرایط آزمایشگاهی مهار می کند. Anagnostopoulou و همکاران خواص آنتی اکسیدانی فراکسیون اتیل استات پوست میانی پرتقال ناحیه جنوبی مصر را گزارش کرده اند. این ترکیبات از نوع فلاونوئیدها (فلاونول ها و اسیدهای فنولیک) بودند (۱۷). عصاره متانولی پرتقال و فراکسیون دی کلرومتانی آن فعالیت ضد

بحث

شناخت دقیق خواص درمانی و کاربرد انواع مختلف محصولات طبیعی و گیاهان دارویی موجود در کشور پهناورمان، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تاکنون فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری چندین عصاره گیاهی بررسی شده است. ملک زاده و همکاران MIC عصاره آبی هلیله سیاه را ۱۲۵ mg/l گزارش کردند (۴). در پژوهش رضانی و همکاران MIC اسانس پوست پسته علیه ۱۲ سویه بیمارستانی هلیکوباکتر پیلوری با روش رقت در آگار ۱/۵۵ mg/ml بدست آمد (۵). MIC چند عصاره گیاهی بومی یونان علیه یک سویه استاندارد و ۱۵ ایزوله بیمارستانی هلیکوباکتر پیلوری بین ۰/۶۲۵ تا ۵ mg/ml بدست آمد (۷). حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره سیر برای ۱۹ سویه هلیکوباکتر پیلوری ۲ تا ۵ میلی گرم در میلی لیتر گزارش شده است (۱۴). Tabak و همکاران MIC دارچین را در محیط آگار حاوی امولسیون تخم مرغ ۵۰ µg/ml گزارش کردند (۱۵). در تحقیق حاضر

طبیعی و فراورده های آن ها، عصاره و یا اجزای مؤثره پوست پرتقال می تواند جهت کمک به درمان و یا پیشگیری از عفونت های هلیکوباکتر پیلوری مفید باشد.

نتیجه گیری

نتایج تحقیق نشان داد که عصاره متانولی پوست پرتقال رشد هلیکوباکتر پیلوری را در شرایط آزمایشگاهی مهار می کند. با توجه به خواص دیگری که برای پوست پرتقال گزارش شده است، مصرف آن به عنوان یک فراورده طبیعی در تهیه ی مواد غذایی توصیه می شود. همچنین خالص سازی اجزا و ترکیبات مؤثره پوست پرتقال و بررسی اثر آن ها در شرایط *in vitro* و *in vivo* برای کنترل و پیشگیری از عفونت هلیکوباکتری پیلوری و سرطان ناشی از آن می تواند باارزش باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد انجام شده است که بدین وسیله از مسئولین و همکاران محترم این حوزه تشکر و قدردانی می شود.

جهش در تست ایمز *سالمونلا تیفی موریوم* نشان داد (۱۸). همچنین پرتقال دارای چندین ترکیب شامل سینفرین و آلكالوئیدهاست که به عنوان یک جایگزین ایمن برای افزایش میزان متابولیک و کاهش جذب انرژی پیشنهاد شده است و گزارش هایی مبنی بر این که پرتقال در کاهش وزن و درمان چاقی مفید باشد، وجود دارد (۱۹). O'bryan و همکاران فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی پرتقال را علیه ۱۱ سروتیپ *سالمونلا* با روش انتشار از طریق دیسک گزارش کردند (۲۰).

وجود ترکیبات فلاونوئیدی (۲۱)، پکتین، کاروتنوئید و ترکیبات فنلی (۲۲) در پوست پرتقال گزارش شده است. با توجه به گزارشاتی که در رابطه با اثرات ضد میکروبی فلاونوئیدها (۲۳) وجود دارد، احتمال دارد بخشی از اثرات ضد هلیکوباکتر پیلوری پوست پرتقال مربوط به وجود این ترکیبات در آن باشد. با توجه به این که پوست پرتقال فواید دیگری هم دارد، مصرف آن در تهیه مواد غذایی به جای موادی مثل وانیل که در مقادیر زیاد می تواند برای مجرای گوارشی سمی باشد و یا تنفس و تماس آن با پوست و چشم مضر است (۲۴)، توصیه می شود. به طور سنتی در کشورمان در تهیه یک نوع کیک مرسوم است که پرتقال را با پوست های آن در مایه کیک رنده می کنند. همچنین با توجه به گرایش مردم به محصولات

References

- 1- Tytgat GN, EA Rauws. *The role of Campylobacter pylori in gastrroduodenal diseases. A believers' point of view.* Gastroentrol. Clin. Biol. 1989; 13: 118B-121B.
- 2- Edwards, DI. *Nitroimidazole drugs action and resistance mechanisms. Two mechanisms of resistance.* J. Antimicrob. Chemother. 1993; 31: 9-20.
- 3- Goddard AF, Logan RPH. *Antimicrobial resistance and Helicobacter pylori.* J. Antimicrob. Chemother. 1996; 37: 639-643.
- 4- Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. *Antibacterial activity of black myrobalan (Terminalia chebula Retz) against H. pylori.* International Journal of Antimicrobial Agents. 2001; 18(1): 85-88.
- 5- Ramezani M, Khaje-Karamoddin M, Karimi-Fard V. *Chemical composition and anti-Helicobacter pylori activity of the essential oil of Pistacia vera.* Pharamaceutical Biology. 2004; 42(7): 488-490.
- 6- Shik Shin H, Masuda H, Naohide K. *Bactericidal activity of wasabi (Wasabia japonica) against H. Pylori.* International Journal of Food Microbiology. 2004; 94(3): 255-261.
- 7- Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsas H. *In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines.* Journal of Ethnopharmacology. 2003; 88 (2-3): 175-179.
- 8- Tabak M, Armon R, Potasman L, Neeman I. *In vitro hibition of Helicobacter pylori by extracts of thyme.* Journal of Applied Bacteriology. 1996; 80: 667-672.
- 9- Voravuthikunchai SP, Mitchell H. *Inhibitory and Killing activities of medicinal plants against multiple antibiotic-resistant Helicobacter pylori.* Journal of Health Science. 2008; 54(1): 81-88.
- 10- Zargari A. Medicinal plants. Tehran University Press: Tehran; 1997, 485-488.
- 11- Paul A, Cox PA. *An ethnobotanical survey of the uses for Citrus aurantium.* Economic Botany. 1995; 49 (3): 249-256.
- 12- Boyanova L, Koumanova R, Lazarova E, and JeleV C. *Helicobacter pylori and H. heilmanni in children. A Bulgarian study.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003; 46: 249-252.
- 13- McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl k, Price A, Smith G, Teare L. *H. pylori susceptibility testing by disc diffusion.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2002; 49: 601-604.
- 14- Cellini L, Campli ED, Masulli M, Bartolomeo SD, Allocati N. *Inhibition of Helicobacter pylori by garlic extrect (Allium salivum).* FEMS Immunology and Medical Microbiology. 1996; 13: 277-279.
- 15- Tabak M, Armon R, Neeman I. *Cinnamon extracts, inhibitory effect on H. pylori.* Journal of Ethnopharmacology. 1999; 67(3): 269-277.

- 16-Kivanc M, Akgul A. *Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus*. Flavour and Fragrance Journal. 2006; 1(4-5): 175-179.
- 17-Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Kokkalou E, Assimopolou AN, Papageorgiou VP. *Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry*. Biomedical Chromatography. 2004; 19(2): 138-148.
- 18- Miyazawa M, Okuno Y, Fukuyama M, Nakamura S, Kosaka H. *Antimutagenic activity of polymethoxyflavonoids from Citrus aurantium*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999; 47(12): 5239-5244.
- 19- Haaz S, Fontaine KR, Cutter G, Limidi N, Perumean-Chaney S, Allison DB. *Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update*. Obes Rev. 2006; 7(1): 79- 88.
- 20- O'bryan CA, Crandall PG, Chalova VI, Ricke SC. *Orange essential oils antimicrobial activities against Salmonella SPP*. Journal of food Science. 2008; 73(6): M267-M267.
- 21- Sarin PS, Seshadri TR. *New compounds of Citrus aurantium*, Tetrahedron. 1960; 8(1-2): 64-66.
- 22- Yuan-Chuen Wang, Yueh-Chueh Chuang, Hsing-Wen Hsu. *The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan*. Food Chemistry. 2008; 106 (1): 277-284.
- 23- Cowan MM. *Plant products as antimicrobial agents*. Clinical Microbiological Reviews. 1999; 12: 564-582.
- 24- Makaruk MI. *Toxicity of vanillin*. Gig Sanit. 1980; 6:78-80.