



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "تحقیقات کاربردی اکوفیزیولوژی گیاهی"

دوره ششم، شماره اول، بهار و تابستان ۹۸

<http://arpe.gonbad.ac.ir>

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه پونه آبی (*Mentha aquatica* L.) از منطقه سه هزار تنکابن

رویا ثابت مقدم^{۱*}، راحله سلطانمرادی^۲، بابک باباخانی^۳

^۱ کارشناس ارشد، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن

^۲ کارشناس ارشد، میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی

^۳ استادیار، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

چکیده

مقدمه: پونه آبی (*Mentha aquatica*) گیاه دارویی چند ساله و متعلق به خانواده نعنائیان می‌باشد. خاصیت آنتی اکسیدانی این گونه را می‌توان به حضور گروه‌های فنلی مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی، تانن‌ها و دی‌ترپن‌های فنلی نسبت داد. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه پونه آبی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی اکسیدان‌های سنتزی انجام شد.

مواد و روش‌ها: عصاره آبی، اتانولی و متانولی برگ گیاه پونه آبی با استفاده از دستگاه سوکسله در شرایط کشت درون شیشه‌ای تهیه شد. سپس به‌منظور سنجش میزان ترکیبات فنلی از روش فولین سیوکالتیو، سنجش فلاونوئید توسط اسپکتروفوتومتر و فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که عصاره اتانولی، دارای محتوای فنلی (۷۱۴/۶۴ میکرو اکی‌والان گالیک اسید بر گرم) بیشتری نسبت به محتوای فلاونوئیدی (۴۰۳/۱۶ میکرو اکی‌والان کوئرسیتین بر گرم) بود. همچنین عصاره اتانولی دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بین سه حلال مورد بررسی بود؛ اما در مقایسه با نمونه شاهد (اسیدآسکوربیک) فعالیت آنتی اکسیدانی ضعیف تری نشان داد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی گیاه پونه آبی دارای اثرات آنتی اکسیدانی بالایی بوده و می‌تواند به‌عنوان یک منبع بالقوه آنتی اکسیدان در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: پونه آبی، عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی، رادیکال‌های آزاد

*نویسنده مسئول: Royasabet58@gmail.com

آنتی اکسیدان‌های موجود در رژیم غذایی به لحاظ محافظت بدن در مقابل استرس اکسیداتیو و حفظ سلامت حائز اهمیت هستند. اخیراً توجه به ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی با اثربخشی بیشتر به منظور استفاده در صنایع دارویی و غذایی به دلیل عوارض ناخواسته آنتی اکسیدان‌های مصنوعی افزایش یافته است. ترکیبات فنلی از جمله متابولیت‌های ثانوی گیاهان هستند که به عنوان مهم‌ترین آنتی اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آید. این ترکیبات از هسته‌های آروماتیک و یک یا چند گروه OH ساخته شده‌اند و به فنل‌های ساده، اسیدها فنولیک، فلاونوئیدها، تانن‌های متراکم، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها تقسیم می‌شوند (Karaman et al., 2010). ترکیبات فنلی دارای فعالیت بیولوژیکی متنوع از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی، ضد التهابی و بازکننده عروق می‌باشد. فعالیت آنتی اکسیدان ترکیبات فنلی و نقش مفید آن‌ها در بیماری‌های کرونری، سرطان و بیماری‌های دژنراتیو مغز وابسته به سن بررسی شده است (Sassi et al., 2008). اثر آنتی اکسیدان این ترکیبات به دلیل اثر احیاکنندگی آن‌هاست. آن‌ها به عنوان احیاکننده، دهنده هیدروژن و شلاته‌کننده فلزات عمل می‌کنند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که، دریافت خوراکی آنتی اکسیدان‌ها از طریق مواد غذایی نقش موثری در حفظ و ارتقا سلامت دارد. به عنوان مثال ابتلا به بیماری عروق کرونر و برخی از سرطان‌ها با میزان مصرف غذاهای غنی از پلی فنل‌ها رابطه معکوس دارد. این مطالعات منجر به توجه خاص به منابع طبیعی به منظور یافتن مولکول‌های آنتی اکسیدان شده است.

گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنلی هستند که در تمام اندام‌های گیاهان یافت می‌شود. بنابراین، این ترکیبات جزء مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند (Siahpoosh and Amraee, 2011). گزارش شده گیاهانی با سطوح بالای آنتی اکسیدان، در برابر آسیب‌های اکسیداتیو مقاومت می‌کنند. توانایی بافت‌های گیاهی برای تجهیز کردن دفاع آنزیماتیک در مقابل پراکسید کنترل نشده لیپید، شاید مهم‌ترین مقاومت آن‌ها در برابر این قضیه باشد. اولین سلاح آنتی اکسیدان داخل سلولی گیاه به شدت به وضعیت متابولیکی خود وابسته بوده و دائماً به نوسانات محیطی پاسخ می‌دهند (Ahmad et al., 2008).

پونه آبی با نام علمی *Mentha aquatica* نوعی گیاه معطر متعلق به خانواده Lamiaceae و جنس *Mentha* است. جنس *Mentha* در فلور ایران ۶ گونه را به خود اختصاص داده است. گونه‌های این جنس به طور کلی تحت عنوان نعناع و پونه در ایران معروف می‌باشند. پونه آبی بومی مناطق شمال کشور است که در حاشیه جریان آب-های ملایم و کم عمق یافت می‌شود. برگ‌های این گیاه به عنوان سبزی خوراکی و عامل طعم‌دهنده مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jemzad, 2012). گیاهان خانواده نعناع به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی توجه محققان زیادی را به خود جلب نموده‌اند. قسمت‌های مختلف این گیاه دارای تانن، مواد رزینی، پکتیکی، قند و اسانس است (NatureGate, 2013).

پراکاش و همکاران (Prakash et al., 2001) گزارش نمودند که، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی متنوعی در گونه‌های مختلف خانواده نعنائیان وجود دارد و اغلب بین محتوای این ترکیبات و خاصیت آنتی اکسیدانی این گونه‌ها رابطه‌ای مستقیم وجود دارد. سینگ و همکاران (Sing et al., 2015) فعالیت‌های ضدباکتری و آنتی اکسیدانی عصاره *Mentha Piperita* L. را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آن حاکی از قوی بودن فعالیت آنتی اکسیدانی *Mentha Piperita* L. بود. با توجه به بومی بودن گیاه پونه، دسترسی آسان، قیمت ارزان و هم‌چنین

ارزش غذایی و دارویی بالا این گیاه (Jemzad, 2012)، هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه پونه آبی از منطقه سه هزار تنکابن بود. این مطالعه می تواند مقدمه ای جهت استفاده علمی از عصاره این گیاه در صنایع غذایی باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش بخش های هوایی (برگ) گیاه پونه آبی در مرحله رویشی در اواسط تیر ۱۳۹۴ از منطقه سه هزار تنکابن جمع آوری گردید. نام و جنس این گیاه در هرباریوم دانشگاه آزاد واحد تنکابن مورد تأیید قرار گرفت. برگ های گیاه از ساقه جدا شده و سپس در مجاورت جریان هوا و در دمای اتاق بر روی پارچه ای تمیز پهن گردیدند و دور از نور مستقیم خورشید و بدون رطوبت و در سایه خشک شدند. پس از خشک شدن آن ها را آسیاب نموده و نمونه برای عصاره گیری آماده گردید.

مقدار ۴۰ گرم پودر گیاه خشک شده در سایه، به صورت جداگانه با ۵۰۰ میلی لیتر متانول، اتانول و آب مقطر به روش سوکسله عصاره گیری شد. پس از اتمام کار عصاره های به دست آمده در خلاء و در دمای محیط به مدت ۴ روز خشک شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شدند (Roozitalab, 2012). جهت رقیق سازی عصاره ها یک گرم از عصاره مورد نظر به لوله حاوی ۴ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید اضافه شد؛ سپس ۲ میلی لیتر از آن برداشته شد و به لوله دوم انتقال داده شد. این عمل تا لوله آخر تکرار گردید به این ترتیب از عصاره های مورد نظر به صورت جداگانه رقت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید (Roozitalab, 2012).

جهت تعیین میزان ترکیبات فنلی عصاره ها از روش فولین سیوکالتیو استفاده شد. ابتدا ۲/۵۰ میلی لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو ترکیب شده و به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردیدند، سپس ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم یک مولار اضافه گردید. جذب نمونه ها پس از ۱۵ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد و نتایج به صورت میکرواکی والان اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شدند (Roozitalab, 2012).

جهت تعیین مقدار فلاونوئید موجود در عصاره ها از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره به ۱/۵ میلی لیتر متانول و ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ استات پتاسیم یک مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند، و در مرحله آخر جذب ترکیب مورد نظر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. میزان فلاونوئید براساس میکرواکی والان کوئرستین بر گرم عصاره گزارش گردید (Iwalokun et al., 2003).

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به روش DPPH اندازه گیری شدند (Brand-Williams et al., 1995). برای این منظور ابتدا محلول هایی با غلظت های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) از عصاره در حلال متانول آماده شدند. سپس ۲ میلی گرم DPPH با غلظت ۱ میلی مولار به لوله ها اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنتی اکسیدانی مطابق فرمول زیر به صورت درصد محاسبه شد.

$$IC_{50} = [(A_{DPPH} - A_{extract}) / A_{DPPH}] \times 100$$

A_{DPPH} : جذب کنترل (شامل تمامی عوامل مثل DPPH و حلال ولی بدون عصاره)

$A_{extract}$: جذب عصاره مورد آزمایش

IC_{50} : عبارتند از غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد به دام اندازی رادیکال آزاد در آن صورت می گیرد.

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. داده ها بدست آمده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس، تجزیه و تحلیل شدند. هم چنین مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. تمامی سنجش ها به صورت میانگین $\pm$ اشتباه معیار گزارش شدند. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

در پژوهش حاضر نتایج بدست آمده از جدول آنالیز واریانس تأثیر نوع حلال بر میزان فنل کل نشان داد که بین نوع حلال و میزان فنل کل اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۱). با بررسی مقایسه میانگین تأثیر نوع حلال بر میزان فنل کل مشاهده شد که بیشترین میزان فنل کل به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی و آبی با مقادیر ۷۱۴/۶۴ و ۳۹۱/۲۵ میکرواکی والان گالیک اسید بر گرم عصاره خشک بود (شکل ۱).

هم چنین بررسی نتایج حاصل از آنالیز واریانس تأثیر نوع حلال بر میزان فلاونوئید در گیاه پونه آبی نشان داد که بین نوع حلال و میزان فلاونوئید اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد وجود دارد (جدول ۱). بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی و آبی به ترتیب با مقادیر ۴۰۳/۱۶ و ۸۷/۵۳ میکرواکی والان کوئرستین بر گرم عصاره خشک در گیاه پونه آبی بود (شکل ۲).

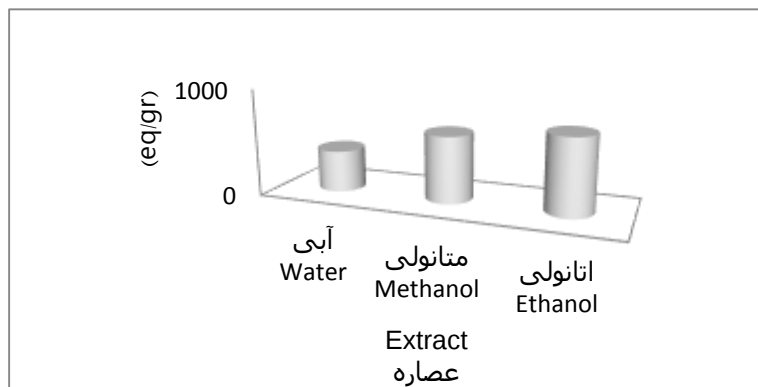
جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نوع حلال بر میزان فنل کل و فلاونوئید در گیاه پونه آبی

Table 1- Analysis of variance (MS) of the effect of solvent type on total phenol and flavonoids in *Mentha aquatica*

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی DF	فلاونوئید Flavonoid		فنل کل Total phenol	
		میانگین مربعات MS	نسبت F F ratio	میانگین مربعات MS	نسبت F F ratio
حلال Solvent	2	75024	7342**	88335	3059**
خطا Error	6	1.02		0.6	

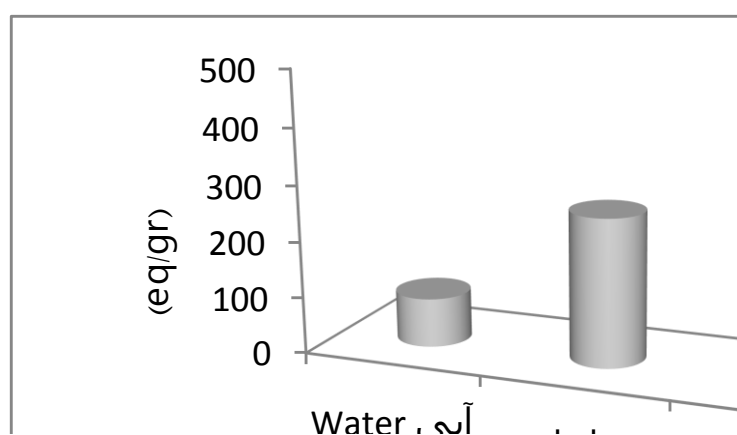
ns, * و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and one percent probability, respectively.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر نوع حلال بر میزان فنل کل در گیاه پونه آبی

Figure 1- Mean comparison of effect of solvent type on total phenol content in *Mentha aquatica*



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر نوع حلال بر میزان فلاونوئید در گیاه پونه آبی

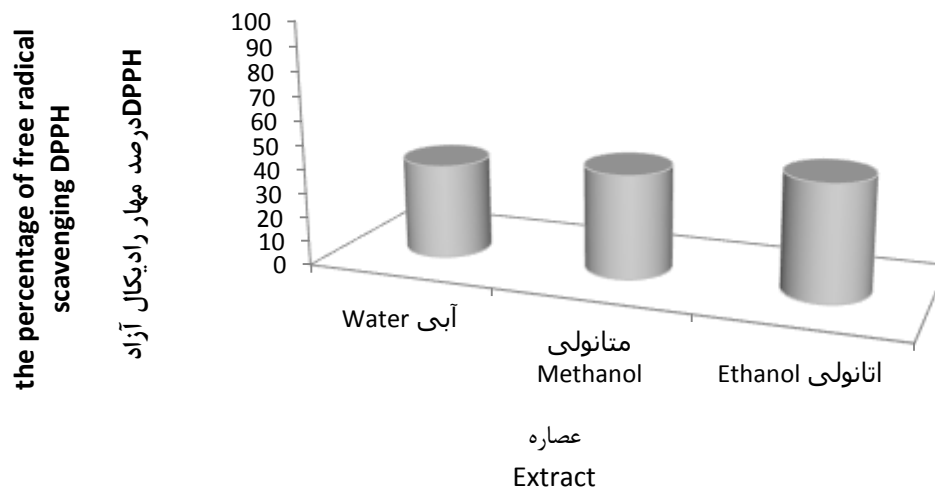
Figure 2- Mean comparison of effect of solvent type on the amount of flavonoids in *Mentha aquatica*

در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه پونه آبی به روش DPPH نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس نشان داد که بین نوع حلال، غلظت و اثر متقابل نوع حلال و غلظت و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد وجود دارد (جدول ۲). نتایج بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی سه عصاره آبی، متانولی و اتانولی گیاه پونه در حضور نمونه شاهد اسیدآسکوربیک در شکل ۳ آمده است بر همین اساس نتایج نشان داد که عصاره اتانولی دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بین سه حلال مورد بررسی می باشد. اما در مقایسه با نمونه اسیدآسکوربیک فعالیت آنتی اکسیدانی ضعیف تری دارد.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر نوع و غلظت حلال بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH
Table 2- Analysis of variance (ANOVA) of type and concentration solvent on the percentage of DPPH free radical containment

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی DF	میانگین مربعات MS	نسبت F F ratio
حلال Solvent	3	1289**	2723
غلظت Concentration	5	982**	2075
حلال × غلظت Solvent × Concentration	15	16.4**	34.7
خطا Error	48	-	2.1

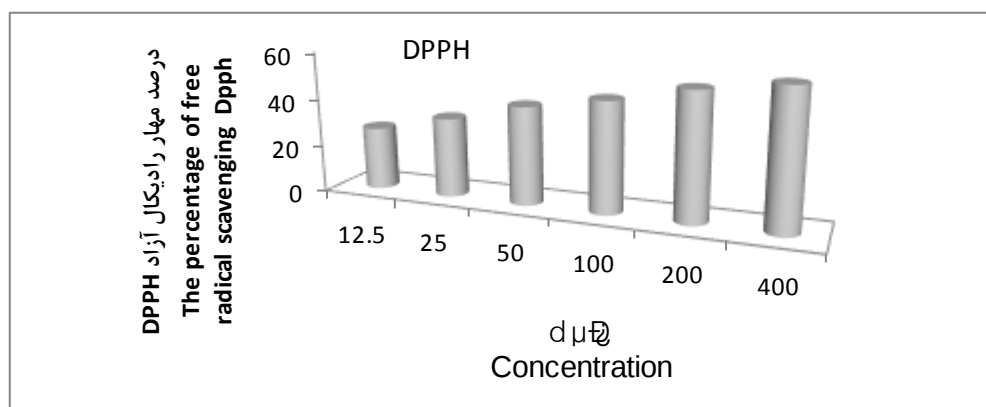
ns, * و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.
ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and one percent probability, respectively.



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر نوع نمونه بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH
Figure 3- Mean comparison of effect of the solvent type on the DPPH free radical inhibitor

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی بین غلظت‌های مختلف نمونه های مورد بررسی که شامل سه عصاره آبی، متانولی و اتانولی گیاه پونه آبی و یک نمونه شاهد اسیدآسکوربیک (۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) بود، نشان داد که با افزایش غلظت از ۱۲/۵ به ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر درصد مهار رادیکال آزاد

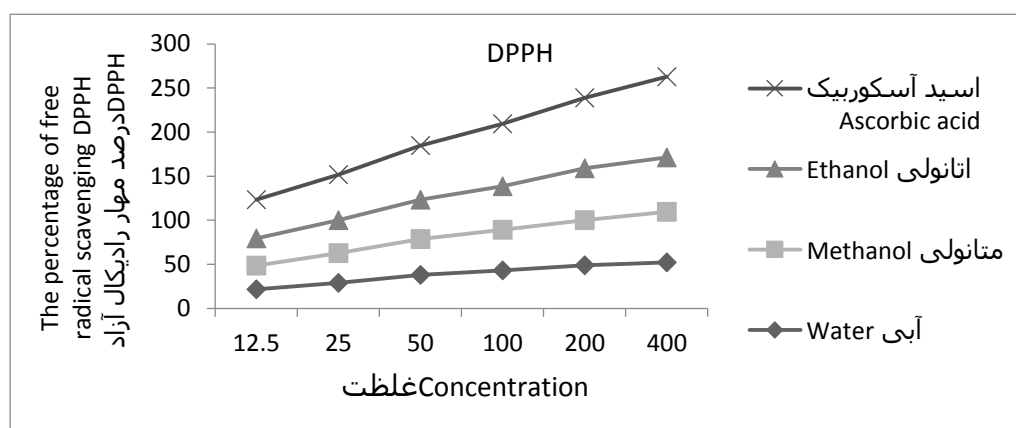
DPPH افزوده گردید. بطوری که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر غلظت حلال بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

Figure 4- Mean comparison of effect of solvent concentration on the percentage of DPPH-free radical inhibitors

همچنین اسیدآسکوربیک در تمامی غلظت‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی از خود نشان داد. در بین عصاره‌ها عصاره اتانولی در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و عصاره آبی در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در روش DPPH از خود نشان دادند (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع نمونه و غلظت حلال بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

Figure 5- Mean comparison of effect interactions between the sample type and the solvent concentration on the DPPH free radical scavenging percentage

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان فنل کل، فلاونوئید و IC₅₀ در گیاه پونه آبی

Table 3- Mean comparison of total phenol, flavonoid and IC₅₀ values in *Mentha aquatic*

عصاره Extract	فنل کل Total phenolic (μega/gr)	فلاونوئید Flavonoid (μega/gr)	IC ₅₀ (μg/ml)
آبی Water	0.28 ± 391.25 c	0.7 ± 87.53 c	300.54 ± 1.8
متانولی Methanol	0.7 ± 652.46 b	0.4 ± 262.92 b	1.3 ± 240.45
اتانولی Ethanol	0.3 ± 714.64 a	0.4 ± 403.16 a	1.4 ± 170.77

ns, * و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and one percent probability, respectively.

نتایج همبستگی بین ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که بین میزان فنل کل و فلاونوئید، فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH و میزان فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد (جدول ۴).

جدول ۴- همبستگی بین صفات مورد بررسی

Table 4- Correlation between studied traits

	DPPH	فنل کل Total phenolic	فلاونوئید Flavonoids
DPPH	-		
فنل کل Total phenolic	0.919 **	-	
فلاونوئید Flavonoids	0.962 **	0.962 **	-

ns, * و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and one percent probability, respectively.

بحث

در دهه های اخیر به دلیل بروز مقاومت های دارویی، به گیاهان دارویی به عنوان مخازن طبیعی توجه شده است. استفاده از گیاهان دارویی به لحاظ پایین بودن عوارض جانبی آن نسبت به داروهای شیمیایی از گذشته های دور برای درمان انواع بیماریها مورد توجه مردم بوده و در سالهای اخیر روند روبه رشدی پیدا کرده است (Cowan, 1999).

آنتی اکسیدان های طبیعی بیشتر در گیاهانی موجود می باشد که حاوی ترکیبات فنلی هستند. محتوای فنلی و ترکیبات گیاه به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی وابسته می باشد. ترکیبات آنتی اکسیدان فراوانی در گیاهان موجود

میباشند و شناسایی تک تک آنها کاری دشوار میباشد. این ترکیبات به دلیل ماهیت آبدوستی خود در واکوئل‌ها (و بخشی از دیواره سلولی) جای گرفته‌اند. جایی که اغلب رادیکال‌های آزاد (به استثنای H_2O_2) به آسانی قادر به نفوذ به آنجا نیستند (Cooper-Driver and Bhattacharya, 1998). بنابراین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با سنجشهای متعدد ارزیابی میشود. در این تحقیق علاوه بر اندازه گیری محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه به روش رنگسنجی، ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه به وسیله روش روبش رادیکالهای آزاد DPPH صورت گرفت. تست DPPH یکی از قدیمی‌ترین روش‌های سنجش غیرمستقیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که برای یافتن ترکیبات دهنده هیدروژن در مواد طبیعی پیشنهاد شده است. این تست اختصاصی عمل می‌کند و به خصوص با ترکیباتی که حاوی گروه هیدروکسیل می‌باشند، واکنش می‌دهد (Roginsky and Lissi, 2005). تعداد زیاد مطالعات انجام شده در مورد استخراجات گیاهی نشان میدهد که عصاره‌های گیاهی اثرات دوگانه آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی دارند که مشابه مطالعه ما در این زمینه بود. عموماً جهت استخراج، فنل‌ها از منابع گیاهی حلال‌های الکلی به صورت مخلوط با آب، مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین استفاده از امواج فراصوت به علت تخریب غشای سلول و افزایش نفوذ حلال به داخل، سبب خروج میزان بیشتری از ترکیبات فنلی به محیط حلال می‌شوند. در نتیجه بازده استخراج و میزان کل ترکیبات فنلی عصاره افزایش می‌یابد (Trabelsi et al., 2010, Biesaga, 2011).

در پژوهش حاضر، بیشترین میزان تام فنلی مربوط به عصاره اتانولی پونه آبی (*Mentha aquatica*)، معادل ۱۲۱/۴۹ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره خشک و کمترین میزان تام فنلی مربوط به عصاره آبی *Mentha aquatica* معادل ۶۶/۵۱ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد. همچنین همبستگی مثبتی بین محتوای تام فنلی و اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها مشاهده شد. مزیت عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی، استخراج مقدار بیشتری از ترکیبات پلی فنلی می‌باشد. همچنین، کاربرد عصاره‌های اتانولی به طور محسوسی مقدار فلاونوئیدهای محلول را افزایش داده بود که انعکاس آن در افزایش خاصیت بازدارندگی، نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فوق را به خوبی اثبات می‌کرد. این پدیده از آنجا حائز اهمیت است که عصاره‌های آبی فاقد آثار سوء ناشی از حضور حلال‌های سمی و خطرناک نظیر متانول و اتانول هستند و به راحتی در صنایع غذایی، دارویی و نوشیدنی‌ها قابل استفاده می‌باشند. در حالی که عصاره‌های هیدروالکلی بیشتر برای مصارف غیرخوراکی (مصرف در پمادها و استعمال خارجی) می‌تواند کاربرد داشته باشد.

در مطالعه‌ای روی پونه سای گربه‌ای یا نعنای گربه‌ای مشاهده شد که محتوای تام ترکیبات فنلی آن معادل ۲/۲۶ درصد گالیک اسید در عصاره بود (Adiguzel et al., 2009) که به مراتب از گیاه مورد مطالعه ما کمتر می‌باشد. در تحقیقی دیگر روی *M. Piperita* مشخص شد که میزان محتوای تام فنلی ۱۳/۴ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم پودر عصاره تعیین گردید (Ebrahimzadeh et al., 2010) که به مراتب از گیاه ما پایین تر میباشد. در مطالعه دیگری که روی گیاه اوجی صورت گرفت، میزان محتوای تام فنلی مربوط به عصاره متانولی، ۷۹/۵۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره تعیین شد (Salmaniyan et al., 2013). که به مراتب از گیاه مورد مطالعه ی ما کمتر بود. این اختلافات میتواند به روش استخراج و ویژگی های گیاهان از جمله رویشگاه و فصل برداشت

ارتباط داشته باشد. علاوه بر تاثیر شرایط محیطی، زمان برداشت، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری، میزان و نیز نوع ترکیبات فنلی در گونه‌های مختلف یک جنس نیز متفاوت است (Antolovich et al., 2000). در این مطالعه محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره اتانولی، متانولی و آبی *Mentha aquatica* به ترتیب معادل ۱۲۱/۸۵، ۷۹/۴۶ و ۲۶/۴۵ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره خشک اندازه گیری شد، که میزان محتوای تام فلاونوئیدی عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی بیشتر بود. این مسئله به دلیل قدرت حلالیت متفاوت حلال برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی با قطبیت‌های مختلف می باشد (Marinova and Yanishlieva, 1997). نتایج بدست آمده در این پژوهش با تحقیقات Senol و همکاران مطابقت دارد (Şenol et al., 2010). در یک بررسی که توسط مولدوان و همکارانش (Moldovan et al., 2014) روی *M. M. x rotundifolia* و *M. X piperita var. Officinalis f. Pallescens* صورت گرفت، مشخص شد که میزان محتوای تام فلاونوئیدی آن‌ها به ترتیب برابر با ۹/۷۸، ۸/۶۲، ۷/۶۰ و ۹/۶۷ گرم کوئرستین در هر صد گرم گیاه بود که با تبدیل واحدها مشخص شد که به مراتب از گیاه ما بالاتر بوده است. بنابراین بسته به نوع روش عصاره‌گیری و حلال مورد استفاده، میزان استخراج مواد مؤثره در جمعیت پونه آبی ممکن است کاهش یا افزایش یابد و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها نیز به تبع آن کمتر یا بیشتر شود. همانطور که نتایج نشان داد نوع حلال تأثیر بسزایی در میزان استخراج ترکیبات مؤثره گیاه داشت. حلال‌های قطبی به کار رفته مانند اتانول، متانول و آب توانایی بیشتری برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی داشتند. ارجحیت حلال‌های هیدروالکلی برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌تواند ناشی از حضور اشکال گلیکوزیدی و قطبی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی حل شده در این حلال‌ها باشد که در خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه فوق نقش مؤثری دارند. معمولاً ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی پس از سنتز در نتیجه پیوند با قندها در یک یا چند جایگاه مخصوص به صورت محلول در آمده و در واکوئل‌ها ذخیره می‌گردند. در بخش بررسی اثرات آنتی اکسیدانی از روش فعالیت روبش رادیکال DPPH استفاده شد. غلظتی از عصاره گیاه یا آسکوربیک اسید به عنوان ماده استاندارد که توانایی ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH را دارا بودند (IC_{50}) به دست آمد. باید توجه داشت در این شرایط هر چه مقدار IC_{50} کوچکتر باشد، خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتر خواهد بود. در این مطالعه مقادیر IC_{50} به دست آمده برای عصاره آبی، متانولی و اتانولی گیاه *Mentha aquatica* به ترتیب برابر با ۳۰۰/۵۴، ۲۴۰/۴۵ و ۱۷۰/۷۷ میکروگرم در میلی لیتر و در مورد آسکوربیک اسید ۲۳/۸۳ میکروگرم در میلی لیتر بود. نتایج همبستگی بین ترکیبات فنلیک و فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که بین میزان تام فنل و فلاونوئید، تام فنل و فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH همبستگی مثبت و معناداری وجود دارد. در مطالعه کامکار و همکارانش (Kamkar et al., 2011) نتایج ارزیابی فعالیت پاد اکسایشی عصاره متانولی و اسانس واریته پولگیوم نعنای ایرانی حاکی از آن بود که با افزایش غلظت عصاره فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH افزایش یافته و این فعالیت نسبت به اسانس بیشتر بود. در مطالعه گلوس و همکارانش (Golluce et al., 2007)، میزان DPPH عصاره متانولی *Mentha longifolia* ۴/۵۷ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد که به مراتب بیشتر از مطالعات ما در این زمینه بود.

در مطالعه کامکار و همکارانش (Kamkar et al., 2011) میزان عصاره آبی، متانولی و اتانولی گیاه *Mentha longifolia* به ترتیب معادل ۱۰۰، ۵۰ و ۵۳/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که در مقایسه با گیاه مورد مطالعه ما اثر آنتی اکسیدانی قویتری داشتند. در ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره متانولی پونه *Mentha longifolia* توسط گلوس و همکارانش با روش DPPH میزان IC_{50} عصاره متانولی ۷۴/۴ میکروگرم در میلی لیتر اعلام شد که در مقایسه با گیاه مورد مطالعه ما، اثر آنتی اکسیدانی ۳ برابر قویتری داشتند. در مطالعه‌ای دیگر روی عصاره هیدروالکلی گیاه *Mentha aquatica* و *Malva sylvestris* میزان IC_{50} به ترتیب ۲۹ و ۶۰۶ میکروگرم در میلی لیتر بود که عصاره هیدروالکلی گیاه *Mentha aquatica* به مراتب از گیاه ما قویتر می‌باشد (Conforti et al., 2008).

در مطالعه صبورا و همکاران (Sabura et al., 2014) بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی در روش DPPH مربوط به عصاره متانولی اندازه گیری شد که در مطالعه ما بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به عصاره اتانولی اندازه گیری شد. مزیت عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و متانولی، استخراج مقدار بیشتری از ترکیبات پلی فنلی می‌باشد. این بدین معناست که آنها بیشتر روی دیواره سلولی و تخریب دانه ها موثرند که باعث استخراج پلی فنلها از آنها میشود. عاملی که باعث میشود عصاره های الکلی کاربردی تر از عصاره آبی باشند، آنزیم پلی فنل اکسیداز است که باعث از بین بردن پلی فنل ها درون عصاره های آبی میگردد، در حالی که در متانول و اتانول این آنزیم غیرفعال می‌باشد.

نتایج تائیدکننده آن است که گونه نعنای می‌تواند به عنوان یک منبع مطلوب از پلی‌فنل‌ها با خواص آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد. ارزیابی اثر آنتی اکسیدانی این گیاه با استفاده از رادیکال‌های آزاد DPPH روشی آسان، سریع و دقیق برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدان‌های آبدوست آن‌ها بود. پایین بودن ارزش IC_{50} عصاره‌های آبدوست، اهمیت محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی پونه آبی را خاطر نشان ساخت. از سوی دیگر با بررسی محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه مشخص شد که گیاه حاوی ترکیبات فنلی بیشتری نسبت به ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. همچنین میزان ترکیبات فنلی در مقایسه با سایر گونه‌های جنس پونه، در تعدادی از مطالعات بیشتر و در تعدادی از موارد کمتر مشاهده شد. بنابراین برای دستیابی به حداکثر خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه پونه آبی، باید با توجه به نوع جمعیت و نوع بهره‌برداری، از روش استخراج و حلال مناسب استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم و مسئولان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به خاطر همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

Adiguzel A., Ozer H., Sokmen M., Gulluce M., Sokmen A., Kilic H., Sahin F. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. Polish Journal of Microbiology, 58 (1): 69-76.

- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. 2008. reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51 (3): 167-173.
- Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruit. *Analyst*, 125: 989-1009.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A., Del Rio J.A. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 45: 4505-4515.
- Biesaga M. 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal Chromatography A*, 1218: 2505-2512.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Giancarlo A., Uzunov D., Tubaro A. 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 144-151.
- Cooper-Driver G.A., Bhattacharya M. 1998. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*, 49: 1165-1174.
- Cowan M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4):564-82.
- Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.F., Nabavi S.M., Eslami B. 2010. Antioxidant and antihemolytic activities of *M. piperita*. *Pharmacologyonline*, 1: 744-52.
- Golluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozken H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L.ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103: 1449 - 56.
- Iwalokun R.A., Gbenle G., Adewole T.A., Smith S.I., Akinsinde K.A., Omonigbehin E.O. 2003. Effects of *Ocimum gratissimum* L essential oil at subinhibitory concentrations on virulent and multidrug-resistant *Shigella* strains from Lagos, Nigeria. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica*, 3:477-482.
- Jemzad Z. 2012. Flora Iran. Publishing Research Institute of Forests and Rangelands, 76: Pp.1-1066. (In Persian).
- Kamkar A., Shariatifar N., Jamshidi A.H., Jebeli Javan A. 2011. Study the antioxidant activity of essential oil of oregano extract (*Mentha longifolia*) in vitro Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 11(1): 149-185.
- Karaman S., Tutem E., Bas-Kan K.S., Apak R. 2010. Comparison of total antioxidant antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined. HPLC-CUPRAC assay. *Food Chemistry*, 120:1201-9.
- Marinova EM., Yanishlieva N. 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chemistry*, 58(3): 245-8.
- Moldovan R.I., Oprean R., Benedec D., Hanganu D., Duma M., Oniga I., Vlase L. 2014. LC-MS Analysis analysis, Antioxidant antioxidant and Antimicrobial antimicrobial Activities activities for five Species species of *Mentha* Cultivated in Romania. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9(2): 559-566.
- NatureGate A. 2013. Water mint: *Mentha aquatic*, 12-13.
- Prakash A., Rigelhof F., Miller E. 2001. Antioxidant activity. Available from: http://www.medallionlabs.com/downloads/antiox_acti_.pdf. (Accessed 11 May 2012).

- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agriculture and Food Chemistry*, 53(10): 4290-302.
- Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235 – 54.
- Roozitalab A. 2012. Evaluation of the antimicrobial activity of antioxidant plant compounds. M.Sc thesis in plant physiology. Islamic Azad University Tonekabon Branch.
- Saboura A., Ahmadi A., Zeynali A., Parsa M. 2014. Comparison Between the Contents of Phenolic and Flavonoid Compounds and Aerial Part Antioxidant Activity in *Scutellaria pinnatifida* in Two North Iranian Populations. *University of Medical Sciences*, 13(3): 249-66.
- Salmaniyan S.H., Sadeghi Mahonak A., Khamiri M., Mastri Farahani M. 2013. Phenolic acids, microbial and anti-radical activity of methanol extract of leaves of *Ogee*. *Journal of Nutrition and Food Technology*, 2(8): 145-154.
- Sassi A.B., Harzallah-skhir F., Chraief I., Bourgougnon N., Hammami M., Aouni M. 2008. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of (Tunisian) *chrysanthemum trifurcatum* (dest) Batt. and Trab flowerheads. *Elsevier Journal*, 11:324-339.
- Senol F.S., Orhan I., Yilmaz G., Iek M., Şener B. 2010. Acetylcholin esterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria L.* taxa from Turkey. *Food and Chem Toxicol*, 48: 781-8.
- Siahpoosh A., Amraee F. 2011. Antioxidant Capacity of Various Extracts of *Asteragalus Morinus Boiss* Aerial Parts. *Journal Shahid Sadoughi University Medical Sciences*, 19(4):437-44.
- Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Soumaya B., et al. 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*, 43: 632- 639.