



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "تحقیقات کاربردی اکوفیزیولوژی گیاهی"

دوره ششم، شماره اول، بهار و تابستان ۹۸

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

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

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

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

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

^۳استادیار، 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 نعناعیان می‌باشد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گونه را می‌توان به حضور گروه‌های فنلی مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی، تانن‌ها و دی‌ترپن‌های فنلی نسبت داد. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ گیاه پونه آبی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌اکسیدان‌های 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 آنتی‌اکسیدانی 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 کوئرستین بر گرم) بود. همچنین عصاره اتانولی دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین سه حلال مورد بررسی بود؛ اما در مقایسه با نمونه شاهد (اسیدآسکوربیک) فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف تری نشان داد.

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

واژه‌های کلیدی: پونه آبی، عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های آزاد

*نویسنده مسئول: Royasabet58@gmail.com

آنتی‌اکسیدان‌های موجود در رژیم غذایی به لحاظ محافظت بدن در مقابل استرس اکسیداتیو و حفظ سلامت حائز اهمیت هستند. اخیراً توجه به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی با اثربخشی بیشتر به‌منظور استفاده در صنایع دارویی و غذایی به‌دلیل عوارض ناخواسته آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی افزایش یافته است. ترکیبات فنلی از جمله متابولیت‌های ثانوی گیاهان هستند که به‌عنوان مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌شمار 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 آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، ضدالتهابی و بازکننده عروق می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدان این ترکیبات به‌دلیل اثر احیاکنندگی آن‌هاست. آن‌ها به‌عنوان احیاکننده، دهنده هیدروژن و شلاته‌کننده فلزات عمل می‌کنند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که، دریافت خوراکی آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق مواد غذایی نقش موثری در حفظ و ارتقا سلامت دارد. به‌عنوان مثال ابتلا به بیماری عروق کرونر و برخی از سرطان‌ها با میزان مصرف غذاهای غنی از پلی‌فنل‌ها رابطه معکوس دارد. این مطالعات منجر به توجه خاص به منابع طبیعی به‌منظور یافتن مولکول‌های آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدان، 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 آنتی‌اکسیدان 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 به‌طور 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 کم‌عمق یافت می‌شود. برگ‌های این گیاه به‌عنوان سبزی خوراکی و عامل طعم‌دهنده مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jemzad, 2012). گیاهان خانواده نعناع به‌دلیل 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 آنتی‌اکسیدانی این گونه‌ها رابطه‌ای مستقیم وجود دارد. سینگ و همکاران (Sing *et al.*, 2015) فعالیت‌های ضدباکتری و آنتی‌اکسیدانی عصاره *Mentha Piperita* L. را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آن حاکی از قوی بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی *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 آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ گیاه پونه آبی از منطقه سه هزار تنکابن بود. این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده علمی از عصاره این گیاه در صنایع غذایی باشد.

مواد و روش‌ها

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

مقدار ۴۰ گرم پودر گیاه خشک شده در سایه، به‌صورت جداگانه با ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول، اتانول و آب مقطر به روش سوکسله عصاره‌گیری شد. پس از اتمام کار عصاره‌های به دست آمده در خلاء و در دمای محیط به مدت ۴ روز خشک شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند (Roozitalab, 2012). جهت رقیق‌سازی عصاره‌ها یک گرم از عصاره مورد نظر به لوله حاوی ۴ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید اضافه شد؛ سپس ۲ میلی‌لیتر از آن برداشته شد و به لوله دوم انتقال داده شد. این عمل تا لوله آخر تکرار گردید به این ترتیب از عصاره‌های مورد نظر به‌صورت جداگانه رقت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید (Roozitalab, 2012).

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

جهت تعیین مقدار فلاونوئید موجود در عصاره‌ها از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره به ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ استات پتاسیم یک مولار و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر 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 میکرواکی‌والان کوئرستین بر گرم عصاره گزارش گردید (Iwalokun et al., 2003).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش DPPH اندازه‌گیری شدند (Brand-Williams et al., 1995). برای این منظور ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره در حلال متانول آماده شدند. سپس ۲ میلی‌گرم DPPH با غلظت ۱ میلی‌مولار به لوله‌ها اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابق فرمول زیر به‌صورت 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 دام‌اندازی رادیکال آزاد در آن صورت می‌گیرد.

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. داده‌ها بدست آمده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس، تجزیه و تحلیل شدند. هم‌چنین مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. تمامی سنجش‌ها به صورت میانگین \pm اشتباه معیار گزارش شدند. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم‌افزار 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).

هم‌چنین 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).

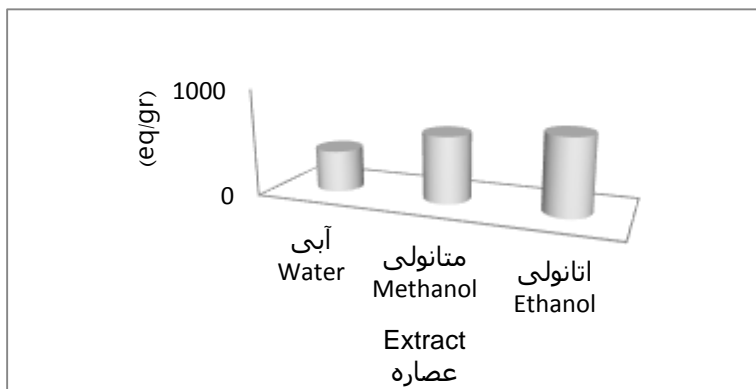
جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نوع حلال بر میزان فنل کل و فلاونوئید در گیاه پونه آبی

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		فنل کل	
		Flavonoid		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	

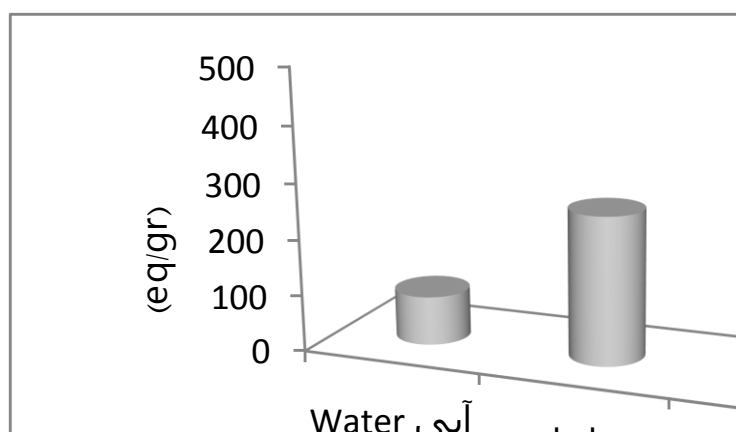
ns, * و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

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

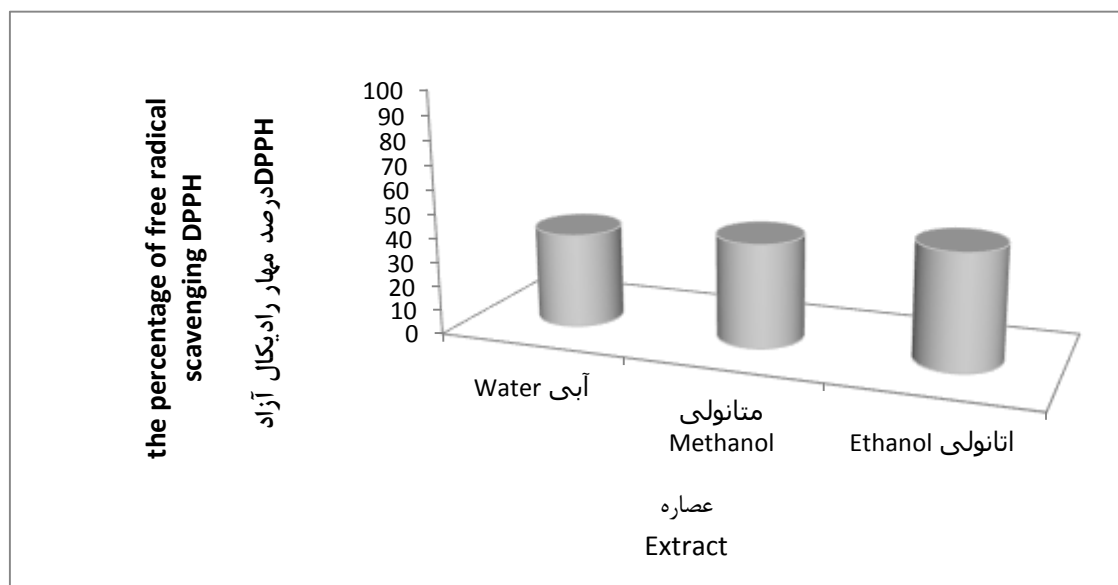
Figure 2- Mean comparison of effect of solvent type on the amount of flavonoids in *Mentha aquatica*

در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی بین سه حلال مورد بررسی می‌باشد. اما در مقایسه با نمونه اسیدآسکوربیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف‌تری 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

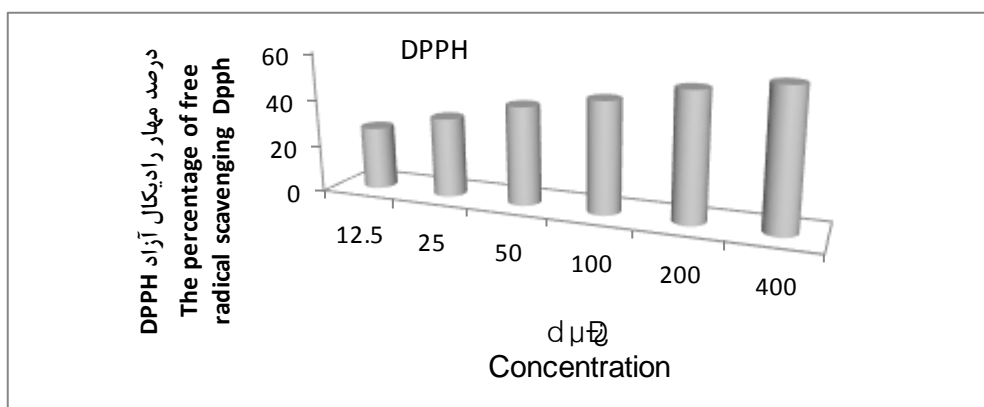
ns, * و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.
ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and one percent probability, respectively.



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 آنتی‌اکسیدانی بین غلظت‌های مختلف نمونه‌های 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

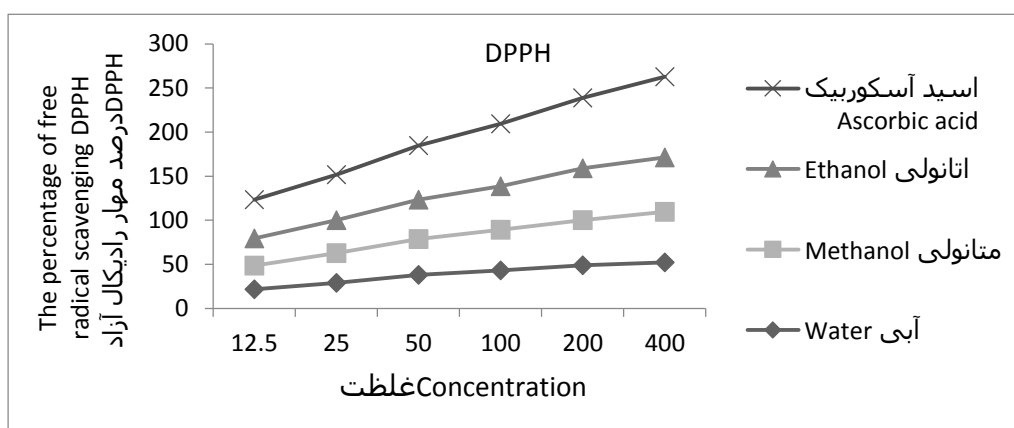
DPPH افزوده گردید. بطوری که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (شکل ۴).



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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی و عصاره آبی در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 aquatica*

عصاره Extract	فنل کل Total phenolic (µg/g)	فلاونوئید Flavonoid (µg/g)	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 معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار 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 آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بین میزان فنل کل و فلاونوئید، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH و میزان فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH همبستگی مثبت و معنی‌داری 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 معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار 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 مقاومت‌های 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).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیشتر در گیاهانی موجود می‌باشند که حاوی ترکیبات فنلی هستند. محتوای فنلی و ترکیبات گیاه به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی وابسته می‌باشند. ترکیبات آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با سنجش‌های متعدد ارزیابی میشود. در این تحقیق علاوه بر اندازه‌گیری محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه به روش رنگسنجی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 محتوی 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 ویژگی‌های 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 میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره خشک اندازه‌گیری 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 آنتی‌اکسیدانی با قطبیت‌های مختلف می‌باشد (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* 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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی می‌تواند ناشی از حضور اشکال گلیکوزیدی و قطبی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی حل شده در این حلال‌ها باشد که در خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 میلی‌لیتر و در مورد آسکوربیک اسید ۲۳/۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج همبستگی بین ترکیبات فنلیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بین میزان تام فنل و فلاونوئید، تام فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 وارپته 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* sp. ۴/۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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 آنتی‌اکسیدانی قویتری داشتند. در ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی پونه *Mentha longifolia* توسط گلوس و همکارانش با روش DPPH میزان IC₅₀ عصاره متانولی ۷۴/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر اعلام شد که در مقایسه با گیاه مورد مطالعه ما، اثر آنتی‌اکسیدانی ۳ برابر قویتری داشتند. در مطالعه‌ای دیگر روی عصاره هیدروالکلی گیاه *Mentha aquatica* و *Malva sylvestris* میزان IC₅₀ به ترتیب ۲۹ و ۶۰۶ میکروگرم در میلی‌لیتر 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 آنتی‌اکسیدانی در روش DPPH مربوط به عصاره متانولی اندازه‌گیری شد که در مطالعه ما بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره اتانولی اندازه‌گیری شد. مزیت عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و متانولی، استخراج مقدار بیشتری از ترکیبات پلی‌فنلی می‌باشد. این بدین معناست که آنها بیشتر روی دیواره سلولی و تخریب دانه‌ها موثرند که باعث استخراج پلی‌فنلها از آنها می‌شود. عاملی که باعث می‌شود عصاره‌های الکی کاربردی‌تر از عصاره آبی باشند، آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز است که باعث از بین بردن پلی‌فنل‌ها درون عصاره‌های آبی می‌گردد، در حالی که در متانول و اتانول این آنزیم غیرفعال می‌باشد.

نتایج تأییدکننده آن است که گونه نعنای می‌تواند به عنوان یک منبع مطلوب از پلی‌فنل‌ها با خواص آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد. ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی این گیاه با استفاده از رادیکال‌های آزاد DPPH روشی آسان، سریع و دقیق برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های آبدوست آنها بود. پایین بودن ارزش IC₅₀ 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 آنتی‌اکسیدانی 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 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.