مقایسه ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی و خاصیت پاداکسایشی عصاره‌های *Mentha spicata* L. و *Mentha longifolia* L. با روش‌های مختلف استخراج

نیر محمدخانی*[1]، ژیلا عباس زاده[2]

تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۳/۱۹
تاریخ پذیرش :۱۳۹۸/۳/۱۸

چکیده

نعنا سبز، Mentha spicata L. و پونه کوهی، Mentha longifolia L کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی و طب سنتی ایران دارند. سرشاخه‌های گیاهان جمع‌آوری شده و اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب (کلونجر) استخراج گردید. عصاره‌گیری با استفاده از دو روش ماسراسیون (حلال‌های آبی، هیدروالکلی و اتانولی) و روش سوکسله (حلال اتانولی) انجام شد. محتوای ترکیبات فنولی کل، محتوای فلاوونوئید کل، ظرفیت پاداکسایشی و درصد مهار تولید رادیکال آزاد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد محتوای ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی، ظرفیت پاداکسایشی و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH تحت تأثیر روش استخراج قرار گرفت. بیش‌ترین میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئید کل در گیاه نعنا سبز در روش سوکسله به‌دست آمد. بالاترین ظرفیت پاداکسایشی مربوط به عصاره هیدروالکلی نعنا سبز بود. روش استخراج با سوکسله بدلیل هزینه فرآوری پایین آن، سادگی عمل، صرف زمان کمتر و حلالیت بیشتر در مقایسه با دیگر روش‌های سنتی مانند خیساندن و پرکولاسیون برای استخراج ترکیبات فنولی توصیه می‌شود. استفاده از سیستم دو حلالی در روش خیساندن با حلال‌های دیگر برای دست‌یابی به خاصیت پاداکسایشی بالا نیازمند تحقیقات بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: ***اسانس، حلال، روش سوکسله، سرشاخه گیاهان، عصاره***

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آروماتیک حاصل از آن‌ها به عنوان منابع طبیعی دارای خاصیت پاداکسایشی، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Kulisic *et al*., 2004). اثرات پاداکسایشی مواد گیاهی تا حدودی به حضور ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی آن‌ها نسبت داده می‌شود که در بخش‌های مختلف گیاهی مانند ریشه، برگ، پوست، میوه و دانه وجود دارند (Mathew & Abraham, 2006). قدرت پاداکسایشی نعنائیان عمدتاً به وجود فنول‌ها بستگی دارد. عمده ترکیبات فنولی موجود

۱- استادیار، گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
*(نویسنده مسئول:n.mohammadkhani@urmia.ac.ir)
۲- دانش آموخته مهندسی تولیدات گیاهان دارویی و معطر، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

در گیاهان تیره نعنا شامل رزمارینیک اسید و فلاوونوئیدها از جمله فلاون‌ها، فلاونون‌ها و اشکال گلیکوزیدی آن‌ها است (Areias *et al*., 2001).

نحوه عصاره‌گیری از این گیاهان، به عنوان اولین مرحله کلیدی برای استخراج ترکیبات پاداکسایشی، بسیار مهم است. اندام گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب‌شده می‌تواند روی کمیت و نوع ترکیبات جدا شده تأثیر بگذارد. از این جهت تجربیات متعددی جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج و مقایسه خاصیت پاداکسایشی عصاره‌های یک گیاه آزمون شده‌است (Kothari *et al*., 2012; Fernandez-Ponce *et al*., 2012). معمولاً کارایی استخراج ترکیبات فنولی تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر روش استخراج، نوع حلال، غلظت حلال، زمان تماس، دمای استخراج، نسبت حلال جامد و اندازه ذرات قرار می‌گیرد (Chirinos *et al*., 2007). عمدتاً برای عصاره‌گیری با حلال از استخراج کننده‌هایی مانند متانول، اتانول و استون یا مخلوطی از آن‌ها با آب استفاده می‌کنند (Abad-Garcia *et al*., 2007). استفاده از آب همراه با سایر حلال‌های آلی در ایجاد یک محیط نسبتاً قطبی اثر دارد که استخراج پلی‌فنول‌ها را تضمین می‌کند (Chirinos *et al*., 2007).

روش سوکسله نیز یک روش عمومی بوده که به طور عمده برای استخراج ترکیبات با فراریت کم یا متوسط که در مقابل حرارت پایدار باشند به کار می‌رود (Loque de Caster & Garcia-Ayuso, 1998). اسانس‌ها را معمولاً از طریق تقطیر گیاهان اسانس‌دار تهیه می‌کنند و روش استفاده، بستگی به نوع و حالت مواد گیاهی دارد. تقطیر با آب رایج‌ترین روش برای استخراج اسانس از گیاهان دارویی می‌باشد که سودمندی آن در تحقیقات نیز ثابت شده‌است (Stahl-Biskup & Saez, 2002).

نعنا سبز یا نعنا خوراکی (*Mentha spicata* L.) را در طب سنتی، برای هضم بهتر مواد، افزایش حرکات دستگاه گوارش، درمان سرماخوردگی، وبا و کاهش التهاب برونش‌ها استفاده می‌کنند. امروزه نیز از این گیاه در تهیه بسیاری از غذاها و هم‌چنین در لوازم آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود.

تحقیقات، فعالیت بالای پاداکسایشی در عصاره گونه‌های مختلف نعنا را نشان داده‌است (Damein Dorman *et al*., 2003; Kamkar *et al*., 2010).

پونه کوهی با نام علمی *Mentha longifolia* (L.) Hud. گیاهی چندساله و معطر است (Stanivljević *et al*., 2014) که در طب سنتی غالباً از دم‌کرده برگ‌های آن به عنوان مدر (Ghaderi *et al*., 2014)، تسریع کننده هضم، رفع آسم، اسپاسم، نفخ، درد معده، سردرد، سرماخوردگی و سرفه و هم‌چنین در استعمال خارجی برای درمان زخم‌ها و غدد متورم استفاده می‌شود و به عنوان پاداکساینده مقوی سیستم ایمنی، ضد قارچ، ضد التهاب و ضد میکروب استفاده می‌شود (Unnithan *et al*., 2013). Akroum و همکاران (2009) با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) وجود اسیدهای فنولی و فلاوونوئیدها به مقدار زیاد را در گیاه پونه کوهی نشان دادند.

استخراج و خالص‌سازی ترکیبات فیتوشیمیایی از منابع طبیعی مورد نیاز است، زیرا این مواد زیست فعال اغلب در تهیه مکمل‌های غذایی، نوشیدنی‌ها، افزودنی‌های غذایی، محصولات دارویی و آرایشی استفاده می‌شوند (Gao & Mazza، 1996).

نعنا سبز و پونه کوهی جزو گیاهان بومی کشور می‌باشند و برای مصارف مختلف غذایی و دارویی بسیار در دسترس هستند. پژوهش حاضر به منظور مقایسه روش‌های استخراج مختلف ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی دو گونه دارویی نعنا سبز و پونه کوهی و مقایسه توان پاداکسایندگی عصاره حاصل از این روش‌های استخراج به انجام رسید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری اندام‌های گیاهی

نمونه‌های اندام‌های هوایی گیاهان نعنا و پونه در فروردین ماه سال ۱۳۹۵ در اوایل رشد از روستای دشه شهرستان پاوه (استان کرمانشاه) با مختصات ´۱۶°۴۶ طول شرقی و ´۳°۳۵ عرض شمالی و ارتفاع ۱۱۵۹ متری از سطح دریا جمع‌آوری شدند. نمونه‌های گیاهی در قالب سه تکرار جمع‌آوری شدند که هر تکرار مربوط به ۲۰ بوته از گیاه نعنا سبز و پونه کوهی بود. بعد از تمیز کردن نمونه‌های گیاهی و پس از شستشو با آب مقطر، نمونه‌های مذکور تحت شرایط طبیعی محیطی در یک اتاقک تاریک به مدت ده روز خشک گردیدند؛ سپس نمونه‌های خشک شده، با هاون پودر شدند و جهت عصاره‌گیری در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

عصاره‌گیری به روش ماسراسیون

در این روش عصاره‌گیری با آب، حلال هیدروالکلی (۷۰٪ اتانول) و اتانول ۹۶ درصد انجام شد. بدین ترتیب که پس از خشک شدن نمونه‌ها، ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۲۰ گرم از ماده خشک هر نمونه اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به مدت ۶ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت و پس از گذشت زمان مذکور، عصاره‌های حاصل به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شدند و در نهایت همه‌ی عصاره‌ها تا زمان انجام آزمون در ظروف استریل غیرقابل نفوذ به هوا و نور، در یخچال نگه‌داری شدند (Sultana *et al*., 2009).

اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر

پس از پودر کردن بخش‌های هوایی گیاه، ۲۰ گرم از هر نمونه به روش تقطیر با آب، توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت عصاره‌گیری شد. از آنجایی که عصاره‌ها نسبت به نور، اکسیژن و دما حساس اند و در چنین شرایطی ترکیبات آن‌ها دچار تغییر و تحول می‌گردد، لذا بلافاصله عصاره استخراج شده به یک شیشه تیره دربسته منتقل و تا زمان آزمایش در یخچال نگه‌داری گردید.

عصاره‌گیری با دستگاه سوکسله

عصاره‌ها به نسبت وزن به حجم (w/v) تهیه شدند. ۲۰ گرم از پودر خشک گیاه توزین شد و در ۲۰ سی سی حلال کلروفرم یا n– هگزان به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا چربی موجود در نمونه پودر شده خارج گردید. پس از گذشت زمان مذکور مخلوط حلال و پودر گیاه فیلتر شد و به همراه ۱۵۰ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد درون بالن ریخته و بالن در شرایط رفلاکس قرار داده شد و عمل عصاره‌گیری به مدت ۴ ساعت ادامه یافت (Herzi *et al*., 2013). عصاره‌های استخراج شده به هر روش قبل از استفاده با حلال مربوطه به حجم یکسان رسانده شدند.

تعیین محتوای ترکیبات فنولی کل

تعیین محتوای ترکیبات فنولی کل به روش فولین- سیوکالتئو (Horwitz, 1984) انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷/۵٪)، ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتئو و ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. جذب محلول حاضر در ۷۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV-visible, WPA S2100, UK) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف گالیک اسید تهیه شد (Herzi *et al*., 2013) و محتوای ترکیبات فنولی کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک گزارش شد.

تعیین محتوای فلاوونوئید کل

محتوای فلاوونوئید کل با استفاده از روش رنگ سنجی کلریدآلومینیوم به روش بونوهی و همکاران (Serra Bonvehi *et al*., 2001) تعیین شد. ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره و ۰/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه با ۱ میلی‌لیتر $AlCl_3$ ۲٪ (محلول ۵٪ استیک اسید در متانول) مخلوط شد و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جذب در ۴۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-visible, WPA S2100, UK) خوانده شد. منحنی استاندارد با قرائت جذب غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه شد. محتوای فلاوونوئید عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک گزارش شد.

ارزیابی ظرفیت پاداکسایشی کل

ظرفیت پاداکسایشی کل عصاره‌ها به روش فسفومولیبدات آنالیز شد (Prieto *et al*., 1999). ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره با ۳ میلی‌لیتر معرف (سولفوریک اسید ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) مخلوط شد به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم $^{\circ}C$ ۹۵ قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. آسکوربیک اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. ظرفیت پاداکسایشی کل به صورت میکروگرم آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه گزارش شد.

بررسی درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH)

فعالیت جاروب رادیکال‌های آزاد با استفاده از رادیکال آزاد ۱ و ۱- دی فنیل- ۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH) به روش بلویس (Blois, 1958) اندازه‌گیری شد. ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر DPPH متانولی ۰/۲ میلی‌مول مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ قرار گرفت. میزان جذب در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای عصاره‌های مربوط به روش خیساندن با آب و روش کلونجر از آب مقطر فاقد عصاره به عنوان شاهد؛ در روش کلونجر و روش خیساندن با اتانول از اتانول ۹۶٪ به عنوان شاهد؛ و در روش خیساندن با حلال هیدروالکلی از اتانول ۷۰٪ به عنوان شاهد استفاده گردید و درصد بازدارندگی با فرمول زیر محاسبه شد (Herzi *et al*., 2013):

% inhibition= 100× [(OD control-OD sample)/OD control]

inhibition٪: درصد بازدارندگی (درصد بازداری پاداکساینده در برابر رادیکال آزاد).

OD control: جذب شاهد

OD sample: جذب نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار مربوط به سه تکرار بیان شده‌اند. نتایج از نظر آماری و اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS,version 19.0 انجام شد. رسم نمودارها با همین نرم افزار صورت گرفت. به منظور تجزیه وتحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون GLM استفاده شد. تست مقایسات چندگانه Tukey ($P<0.05$) برای تعیین تفاوت بین عصاره‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی دو گیاه با روش‌های استخراجی مختلف نشان داد که تفاوت در میزان فنول کل بین روش استخراج و گیاهان، معنی‌دار ($P<0.05$) بود ولی تفاوت اثر متقابل بین روش استخراج و گیاهان معنی‌دار نبود. با توجه به جدول آنالیز واریانس مشاهده شد که تفاوت در میزان فلاوونوئید کل بین روش استخراج، گیاهان و اثر متقابل روش استخراج و گیاهان، معنی‌دار ($P<0.05$) بود. جدول آنالیز واریانس هم‌چنین نشان داد، تفاوت در مقادیر ظرفیت پاداکسایشی کل روش استخراج، گیاهان و اثر متقابل روش استخراج و گیاهان در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). طبق جدول آنالیز واریانس، تفاوت درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد روش استخراج، گیاهان و اثر متقابل روش استخراج و گیاهان معنی‌دار ($P<0.05$) بود (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس مقایسه ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی و خاصیت پاداکسایشی عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		محتوای ترکیبات فنولی کل	محتوای فلاوونوئید کل	ظرفیت پاداکسایشی کل	درصد بازدارندگی
روش استخراج	۴	۲۴/۳۲**	۰/۰۶**	۶۷۹/۶۰**	۵۰۵/۲۰**
گیاه	۱	۳/۱۵**	۰/۰۰۴**	۱۰۷۲۷/۴۱**	۱۷۰۲/۸۰**
روش استخراج × گیاه	۴	۰/۴۹ns	۰/۰۰۲**	۲۲۶/۱۰**	۱۴۱/۲۳**
خطای آزمایش	۲۰	۰/۱۸	۰/۰۰۰	۳۵/۵۶	۱/۲۷
ضریب تغییرات	_	۱۲/۳۹	۱۹/۵۲	۱۱/۱۸	۱۸/۲۲

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ درصد و غیر معنی‌دار.

نوع روش به کار رفته برای استخراج و عصاره‌گیری از بافت‌های گیاهی به نوع بافت گیاهی، نوع ماده جدا شدنی و مقاومت ماده جدا شده به حرارت بستگی دارد و انتخاب یک روش مناسب استخراج می‌تواند غلظت پاداکسایندهای مربوط به گیاه را افزایش دهد. هر روش، راندمان استخراج متفاوتی دارد و ترکیبات مختلفی در عصاره حاصل از هر روش موجود است (Suhaj, 2006). استخراج با حلال در دمای محیط و استخراج با حلال با استفاده از حرارت به روش سوکسله از روش‌های متداول عصاره‌گیری هستند. در این روش‌ها گیاه مورد نظر و حلال به مدت مشخصی در تماس با یکدیگر قرار می‌گیرند و در نهایت، پس از عمل استخراج، حلال جدا می‌شود (Suhaj, 2006).

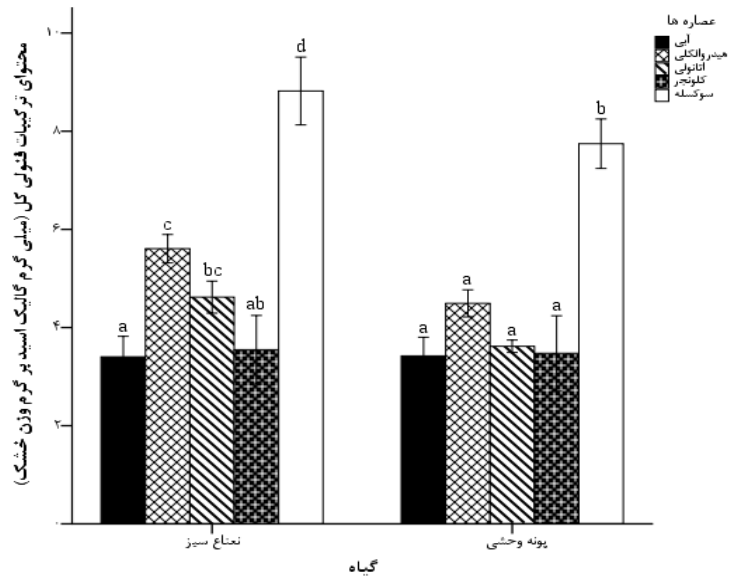
یافته‌های حاصل از بررسی اثر روش‌های استخراج بر محتوای ترکیبات فنولی تام در شکل ۱ نشان داد که بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنولی در گیاه نعنا سبز و پونه کوهی از روش سوکسله به‌دست آمد. هم‌چنین میزان ترکیبات فنولی به دست آمده از روش سوکسله و ماسراسیون (حلال اتانولی و هیدروالکلی) هم در نعنا سبز و هم در پونه کوهی اختلاف معنی‌داری نسبت به هم داشتند ($P<0.05$). با مقایسه هر دو گیاه، بیش‌ترین محتوای تام فنولی مربوط به روش سوکسله و گیاه نعنا سبز با مقدار ۸/۰±۸۲/۶۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک نمونه بود.

طبق نتایج به دست آمده، نوع حلال و نوع روش استخراج دو عامل مؤثر بر میزان بازده استخراج شناخته شدند. نتایج نشان داد که روش سوکسله بیش‌ترین و روش ماسراسیون (عصاره آبی) کم‌ترین بازده در استخراج ترکیبات فنولی را در گونه نعنا سبز داشت. محققانی همچون Pinelo و همکاران (2005)، Yilmaz و Toledo (2004) در پژوهش‌های خود روند استخراج ترکیبات فنولیک را بررسی نمودند. این محققان اعلام داشتند که در دماهای بالا، کاهش در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده‌است که دلیل این موضوع را واکنش‌های پلیمریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند که این موضوع با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت ندارد. Biswas و همکاران (2012) نشان دادند که از بین عصاره‌های مختلف نعنا، عصاره آبی نعنا کم‌ترین

میزان فنول را داشت که بیش‌ترین میزان مهار DPPH را نشان داد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. Barchan و همکاران (2014) بیان کردند که بیش‌ترین ترکیبات فنولی کل به ترتیب در عصاره‌گیری با سوکسله با استفاده از حلال متانول و آب در گیاه *M.spicata* وجود دارد و محتوای ترکیبات فنولی کل در گونه *M.spicata* بیشتر از *M.piperita* و *M.pulegium* می‌باشد که با نتایج پژوهش حاضر تطابق دارد با این تفاوت که در پژوهش حاضر از اتانول به عنوان حلال مورد نظر در دستگاه سوکسله استفاده شد.

نتایج یک مقاله پژوهشی نشان داد که عصاره گل‌آذین گیاه زولنگ (یک گیاه دارویی از خانواده چتریان) دارای محتوای تام فنولی ۵۸/۸، ۶۰/۱ و ۱۰۵/۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب برای سه روش استخراجی التراسونیک، خیساندن و سوکسله بود. نتایج حاکی از وجود مواد فنولی بیش‌تر در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به دو روش دیگر بود (Riekandeh *et al*., 2016)، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

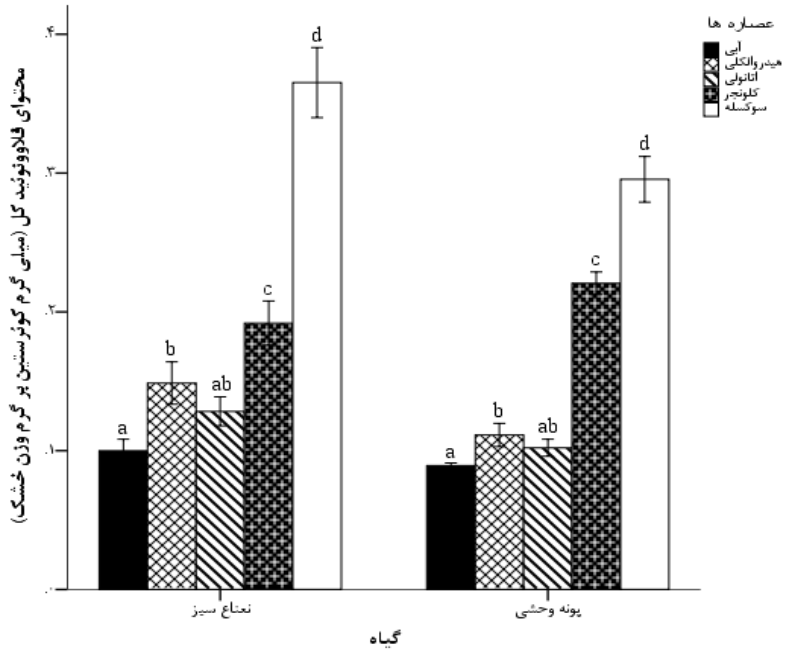
کم‌ترین محتوای ترکیبات فنولی در پژوهش حاضر در روش خیساندن در حلال آب مشاهده شد. این می‌تواند به این دلیل باشد که درجه قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیبات فنولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ترکیبات فنولی ترکیبات حجیم و با قطبیت پایین می‌باشند. در مقایسه با حلال‌هایی مانند اتانول و متانول، استخراج با آب مقدار کمتری از ترکیبات فنولی را به همراه دارد. آب بیش‌ترین ثابت دی الکتریک را نسبت به حلال‌های معمول دارد. بنابراین میزان استخراج پاداکساینده و ترکیبات فنولی توسط آب کمتر می‌باشد (Proestos & Komaitis., 2008).



شکل ۱: مقایسه محتوای ترکیبات فنولی کل عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.

بر طبق شکل ۲ یافته‌های حاصل از بررسی اثر روش‌های استخراج بر محتوای فلاوونوئید تام نیز نتیجه‌گیری شد که روش سوکسله در هر دو گیاه از بازده بهتری برخوردار بود. بین روش سوکسله و استخراج اسانس نیز هم در نعنا سبز و هم در پونه کوهی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$). در کل بیش‌ترین میزان فلاوونوئید کل در روش سوکسله و گیاه نعنا سبز با مقدار۰/۰۲± ۰/۳۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک نمونه به‌دست آمد.

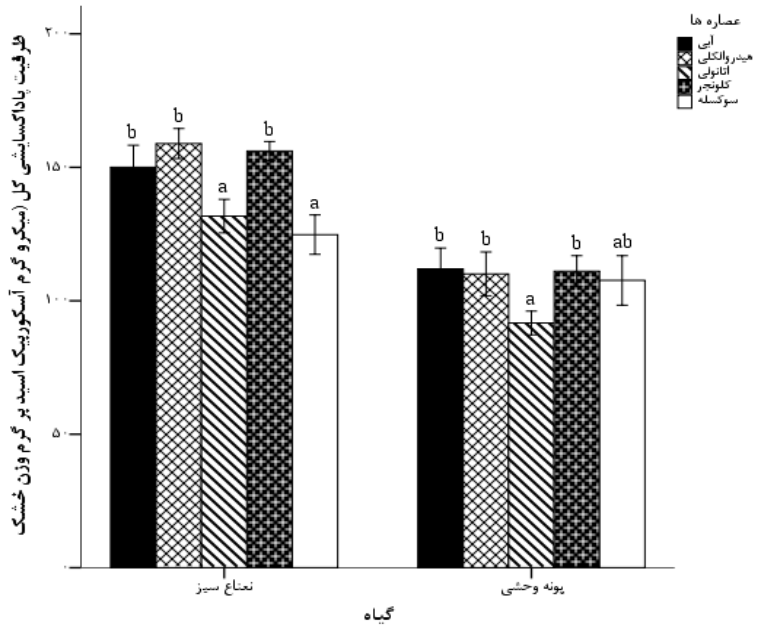
در دهه‌های اخیر، توجه خاصی به اثرات پاداکسایشی فلاوونوئیدها و توانایی آن‌ها در اتصال و مهار رادیکال‌های آزاد شده‌است. Kamkar و همکاران (2010) نشان دادند که اسانس و عصاره‌های آبی و الکلی پونه ایرانی (*Mentha longifolia*) دارای خاصیت پاداکسایشی هستند. Brahmi و همکاران (2012) گزارش کردند برای استخراج ترکیبات پاداکسایشی از نعنا سبز با حلال‌های مختلف در سطح آزمایشگاهی، مخلوطی از اتانول و آب به نسبت ۷۰:۳۰ (V/V) بهترین انتخاب در بین حلال‌های ارزیابی شده در پژوهش‌شان بود که با نتایج پژوهش حاضر که در آن حلال هیدروالکلی گیاه نعنا سبز ظرفیت پاداکسایشی بیشتری از خود نشان داد مطابقت داشت. هم‌چنین، Alara و همکاران (2018) بیان کردند که در استخراج ترکیبات فنلی از ماتریکس گیاهی استفاده از دو حلال بهتر از یک حلال است. حضور آب در فرآیند استخراج، باعث شستشوی پاداکساینده‌های آبدوست می‌شود. تحقیقات اخیر خواص پاداکسایشی و ضد میکروبی گیاه پونه را گزارش کرده‌اند (Tiexera *et al*., 2012).



شکل ۲: مقایسه محتوای فلاوونوئید کل عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.

بررسی ظرفیت پاداکسایشی نمونه‌ها با روش فسفو مولیبدات در شکل ۳ نشان داد که ظرفیت پاداکسایشی کل با روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) در گیاه نعنا سبز با مقدار ۴/۹۰±۱۵۸/۹۰ میکروگرم آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه بیشتر از ظرفیت پاداکسایشی کل با همین روش در گیاه پونه با مقدار ۷/۱۰±۱۱۰/۰۷ میکروگرم آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه است. بیش‌ترین ظرفیت پاداکسایشی کل نیز از بین هر دو گونه دارویی با روش ماسراسیون و عصاره هیدروالکلی در گیاه نعنا سبز به‌دست آمد. در گیاه نعنا سبز از نظر آماری بین روش عصاره‌گیری با سوکسله و روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) وجود داشت.

از نظر ظرفیت پاداکسایشی، Brahmi و همکاران (2014) نشان دادند که پونه‌های جمع‌آوری شده از دو منطقه کشور الجزایر هر دو دارای فعالیت پاداکسایشی بودند، به این دلیل که همه‌ی نمونه‌ها از همان گیاه مادری مشتق شده‌اند، تفاوت بین آن‌ها اساساً به علت شرایط محیطی یا ماهیت حلال استفاده شده می‌باشد که برای پژوهش حاضر می‌توان دلیل دوم را مؤثر دانست و نیز تفاوت در ظرفیت پاداکسایشی نمونه‌های استخراج شده با روش‌های مختلف را به ماهیت روش مورد استفاده نسبت داد؛ بنابراین ظرفیت پاداکسایشی با حلال مورد استفاده برای آماده‌سازی عصاره تغییر می‌کند. پژوهش‌های پیشین طیف وسیعی از فعالیت پاداکسایشی عصاره‌های پونه یا اسانس آن را گزارش کرده‌اند؛ برای مثال عصاره اتانولی، خاصیت پاداکسایشی مشابه (Mata *et al*., 2007) یا بیشتر (Nickavar *et al*., 2008)، در مقایسه با پژوهش حاضر داشتند.

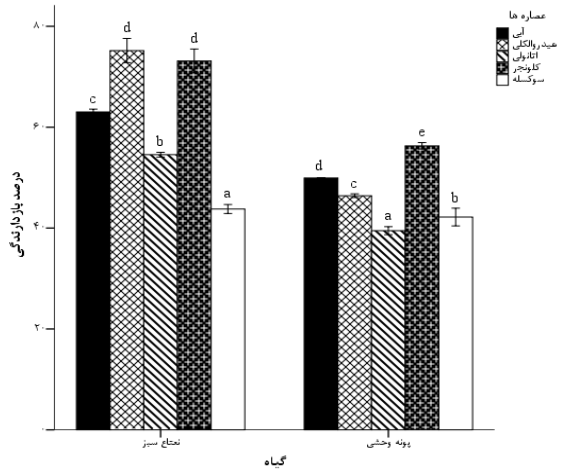


شکل۳: مقایسه ظرفیت پاداکسایشی عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.

با بررسی قدرت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH بر اساس داده‌های به‌دست آمده در شکل ۴ مشاهده شد که نمونه عصاره هیدروالکلی در گیاه نعنا سبز به میزان ۲/۰۹ ± ۷۵/۱۹ درصد با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر عصاره‌ها بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد را به خود اختصاص داد، در حالی که در هر دو گیاه نعنا سبز و پونه کوهی، روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) و اسانس با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) نداشتند.

طبق بررسی‌های صورت گرفته در این تحقیق، روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) در گیاه نعنا سبز با وجود استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کمتر، بیش‌ترین میزان خاصیت پاداکسایشی را از طریق ارزیابی درصد مهار رادیکال آزاد DPPHنشان داد. احتمالا در روش ماسراسیون ترکیبات پاداکساینده دیگری به جز فنول‌ها و فلاونوئیدها استخراج شده که به افزایش خاصیت پاداکسایشی کمک کرده‌است. Biswas و همکاران (2012) هم نتایج مشابهی را گزارش و بیان کردند که فعالیت پاداکسایشی نعنا صرفاً بدلیل وجود پلی فنول ها نمی‌باشد. فعالیت جاروب‌کنندگی عصاره‌های نعنا بررسی شده بستگی به ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی و وجود گروه‌های هیدروکسیل فنولی دارد که قادر به دهندگی الکترون یا هیدروژن‌شان هستند و بدین طریق تشکیل فرآورده نهایی پایدار دارد (Jayaprakasha *et al*., 2008). در ارزیابی میزان جاروب رادیکال DPPH، Fatiha و همکاران (2015) نشان دادند که قوی‌ترین فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال را عصاره اتانولی نعنا سبز یا *M.spicata* داشت که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند.

Al okbi و همکاران (2015) ظرفیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد بالای اسانس پونه آسیایی (*M.longifolia*) را گزارش کردند که به نظر می‌آید اساساً با مقدار مونوترپن‌های کتونی و آلدهیدی این گونه همبسته باشد که مؤید این است که اسانس پونه آسیایی می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سالم و مکمل گندزدا و ضدعفونی‌کننده در داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۴: مقایسه درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار($P<0.05$) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.

Barchan و همکاران (2014) گزارش کردند که خاصیت پاداکسایشی عصاره آبی نعنا بوسیله ارزیابی تست DPPH بیشتر از پونه بود که با نتایج پژوهش انجام شده حاضر هم‌راستا می‌باشد؛ مشاهده کردیم که ظرفیت پاداکسایشی و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH در گیاه نعنا سبز بیشتر از گیاه پونه بود. از این رو یافتن بهینه‌ترین روش استخراج، هم از نظر زمان و هم صرف انرژی، برای دست‌یابی به بالاترین میزان ترکیبات پاداکساینده ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق بین محتوای تام فنول و ظرفیت پاداکسایشی همبستگی منفی مشاهده شد که این همبستگی در پژوهش‌های دیگر نیز اثبات شده‌است و مطابق با نتایج پژوهش پیش‌رو می‌باشد (Tuberoso *et al*., 2010; Laki**ć** *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش توجه به اهمیت روش عصاره‌گیری جهت دست یافتن به خاصیت پاداکسایشی بالا را لازم می داند، لذا توصیه می‌شود که روش خیساندن به دلیل فعالیت پاداکسایشی و جاروب‌کنندگی بالا که هدف اصلی این پژوهش بوده است و سادگی و ارزان بودن این روش، به عنوان یک روش مناسب و آسان مورد توجه قرار گیرد. می‌توان این روش را با حلال‌های دیگر از جمله متانول، استون و یا مخلوط این‌ها را با آب استفاده کرد و یا زمان خیساندن را طولانی‌تر کرد. در کل، نعنا سبز در پژوهش حاضر پاسخ بهتری نسبت به روش‌های مختلف استخراج نشان داد؛ شاید این به دلیل خواص پاداکسایشی بالای این گونه نسبت به گونه پونه وحشی باشد.

منابع

Abad-García, B., Berrueta, L. A., López-Márquez, D. M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B. and Vicente, F. (2007) Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. Journal of ChromatographyA. 1154(1): 87-96.

Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D. and Lalaoui, K. (2009) Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from Mentha longifolia. American Journal of Scientific Research. 4(2): 93-96.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., and Ukaegbu, C. I. (2018) Soxhlet extraction of phenolic compounds from Vernonia cinerea leaves and its antioxidant activity. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 11, 12-17.

Al-Okbi, S. Y., Fadel, H. H. and Mohamed, D. A. (2015) Phytochemical Constituents, Antioxidant and Anticancer Activity of Mentha citrata and Mentha longifolia. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 6(1): 739-751.

Areias, F. M., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreres, F. and Seabra, R. M. (2001) Phenolic fingerprint of peppermint leaves. Food Chemisry. 73(3): 307-311.

Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R. and Laglaoui, A. (2014) The effects of sol-vents polaritiy on the phenolic contents and antioxidant activity of three Mentha species extracts. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(11): 399-412.

Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J. and Zaidul, I. S. M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (Mentha spicata L.) leaves. Food and bioproducts processing. 89(1): 67-72.

Biswas, A. K., Chatli, M. K. and Sahoo, J. (2012) Antioxidant potential of curry (Murraya koenigii L.) and mint (Mentha spicata) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. Food chemistry. 133(2): 467-472.

Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1199-1200.

Brahmi, F., Boulkbache-Makhlouf, L., Yalaoui-Guellal, D., Chibane, M. and Madani, K. H. (2014) Comparative study on the antioxidant effect of aqueous and ethanolicextracts of Mentha pulegium L. grown at two different locations. Phyto Chemistry and Bio Sub Journal. 8(3): 138-149.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. (2007) Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (TropaeolumtuberosumRuíz and Pavón) tubers. Separation and Purification Technology. 55(2): 217-225.

Damein Dorman, H.J., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y. and Hiltunen, R. (2003) Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from Mentha species, hybrids, varieties, and cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 4563-4569.

Fatiha, B., Didier, H., Naima, G., Khodir, M., Martin, K., Léocadie, K. and Pierre, D. (2015) Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian Mentha species: M. spicata (L.), M. pulegium (L.) and M. rotundifolia (L.) Huds (Lamiaceae). Industrial Crops and Products. 74: 722-730.

Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., and de la Ossa, E. M. (2012) Extraction of antioxidant compounds from different varieties of Mangifera indica leaves using green technologies. The Journal of Supercritical Fluids. 72: 168-175.

Gao, L., and Mazza, G. (1996) Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. Journal of Food Science. 61(3): 600-603.

Ghaderi, P., Ahmadi, R., Balkanyian, F., Moridikyia, A., Mahdavi, E. and Tavakoli, P. (2014). In-vitro antibacterial activity of Bunium persicum and Mentha longifolia against Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus.International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences, May 2-3, Antalya, Turkey.

Goli, A. H., Barzegar, M. and Sahari, M. A. (2005) Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts. Food Chemistry. 92(3): 521-525.

Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M. and Condoret, J. S. (2013) Comparison of different methods for extraction from Tetraclinis articulata: Yield, chemical composition and antioxidant activity. Food Chemistry. 141 (4): 3537-3545.

Horwitz, W. (1984) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists. 1-771.

Jayaprakasha, G. K., Girennavar, B. and Patil, B. S. (2008) Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. Bioresource Technology. 99(10): 4484-4494.

Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. and Kamalinejad, M. (2010) The antioxidative effect of Iranian Mentha pulegium extracts and essential oil in sunflower oil. Food and Chemical Toxicology. 48: 1796–1800.

Kothari, V. (2011) Antimicrobial and Antioxidant Properties of Plant Products, Lambert Academic Publishing: Germany; 6.

Kothari, V., Gupta, A., and Naraniwal, M. (2012) Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. Journal of natural remedies. 12(2): 162-173.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food chemistry. 85(4): 633-640.

Lakić, N. S., Mimica-Dukić, N. M., Isak, J. M. and Božin, B. N. (2010) Antioxidant properties of Galium verum L. (Rubiaceae) extracts. Central European Journal of Biology. 5(3): 331-337.

Luque de Castro, M. D. and Garcia-Ayuso, L. E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. Analytical Chemical Acta. 369: 1-10.

Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F. and Araújo, M. E. M. (2007) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. Food chemistry. 103(3): 778-786.

Mathew, S. and Abraham, T.E. (2006) In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. Food and Chemical Toxicology. 44(2): 198-206.

Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M. (2008) Evaluation of the antioxidant properties of five Mentha species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 7(3): 203–209.

Omidbaigi, R. (2005) Production and processing of medicinal plants. Vol. 3. Astane Quds Publ. Tehran, 347 p.

Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical biochemistry. 269(2): 337-341.

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., and Núñez, M. J. (2005) Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(6): 2111-2117.

Proestos, C., and Komaitis, M. (2008) Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. LWT-food science and technology. 41(4): 652-659.

Riekandeh, S. M., Mazandarani, M., Ebrahimzadeh, M. A., and Zargari, M. (2016) Antioxidant activities of Eryngium caucasicum Inflorescence. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 20(5): 946-949.

Sefidkon, F. (2007) Chemistry and Industrial Preparation of Essential oils. Zavesh, Iran, Tehran, 254 p.

Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., Ahmadi, S. (2007). The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of satureja rechinger jamzad. Journal of Food Chemistry. 100: 1054-1058.

Serra Bonvehí, J., Soliva Torrentó, M. and Centelles Lorente, E. (2001) Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in spain. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(4): 1848-1853.

Stahl-Biskup, E. and Saez, F. (2002) Thyme the genus thymus. NY, NJ: Taylor and Francis.

Stanisavljević, D., Dordevic, S., Milenkovic, M., Lazic, M., Velickovic, D., Randelovic, N. and Zlatkovic, B. (2014). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils obtained from Mentha longifolia L. Hudson, dried by three different techniques. Records of Natural products. 8(1): 61.

Suhaj, M. (2006) Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. Journal of Food Composition and Analysis. 19(6-7): 531-537.

Sultana, B., Anwar F. and Ashraf M. (2009) Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules. 14: 2167-2180.

Sweetie, R.K., Chander, R. and Sharma, A. (2007) Antioxidant potential of mint (Mentha spicata L.) in radiation-processedlamb meat. Food Chemistry. 100: 451–458.

Taghiloo, A.H.,(2010) Evaluation of spicula horsemint population are native to Iran by morphological traits and RAPD markers. Master's thesis of Horticulture sciences, Tehran University, 57 p.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O. and Nunes, M. L. (2012) European pennyroyal (Mentha pulegium) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products. 36(1): 81-87.

Tuberoso, C. I. G., Rosa, A., Bifulco, E., Melis, M. P., Atzeri, A., Pirisi, F. M. and Dessì, M. A. (2010) Chemical composition and antioxidant activities of Myrtus communis L. berries extracts. Food Chemistry. 123(4): 1242-1251.

Unnithan, C. R., Gebreselassie, H., Sushen, U., Reddy, D. N., Woldu, A. and Muuz, M. (2013) Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Mentha longifolia L of Mekole, Ethiopia. Journal of Biological and Scientific Opinion. 1(3): 151-153.

Yilmaz, Y., and Toledo, R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. Journal of agricultural and Food Chemistry, 52(2): 255-260.

Comparison of phenolic, flavonoid compounds and antioxidative properties of *Mentha spicata* L. and *Mentha longifolia* L. 's extracts by different extraction methods

N. Mohammadkhani[1*], J. Abbaszadeh[2]

Received:2017.6.9
Accepted:2019.6.8

Abstract

Spearmint (Mentha spicata L.) and Horsemint (Mentha longifolia L.) have abundant uses in food industries and Iranian traditional medicine. The aerial parts of plants were collected and their essential oils were isolated by hydrodistillation method (Clevenger). The extractions were conducted by maceration method (aqueous, hydroalcoholic and ethanolic solvents) and soxhlet method (ethanolic solvent). Total phenolic compounds content, total flavonoid content, antioxidant capacity and percentage of free radical inhibition were measured. The results showed that total phenolic compounds and flavonoid content, total antioxidant capacity and percentage of free radical inhibition were affected by extraction method. The highest total phenolic compounds and flavonoid were obtained by soxhlet method in spearmint. The highest total antioxidant capacity belonged to hydroalcoholic extract in spearmint. The Soxhlet extraction method is recommended because of its low processing cost, simplicity of operation, lesser time consuming and more solubility comparing to other traditional methods such as soaking or percolation in order to extract phenolic compounds. The use of a two-solvent system in the soaking process with other solvents requires further researches to achieve high antioxidant properties.

Key words: Essential oil, Solvent, Soxhlet method, Aerial part of plants, Extract

1- Assistant professor, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran
*(Corresponding Author: n.mohammadkhani@urmia.ac.ir)

2- Graduated of Medicinal and Aromatic Plants Production Engineering, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran