تعیین فعالیت ضدمیکربی و آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اسانس گیاه نعناع *Mentha longifolia Hudson*

مریم عزیزخانی[1*] و مریم عطایی[2]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱٤

[1] مربی دانشگاه غیرانتفاعی خزر محمودآباد و دانشجوی دکترای بهداشت و کنترل و مواد غذایی دانشگاه تهران

[2] دانشجوی دکترای بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشگاه تهران

[*] مسوول مکاتبه: E-mail: azizkhanim@vetmed.ut.ac.ir

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکربی اسانس و عصاره گیاه نعناع *Mentha longifolia hudson* می‌باشد. میزان ترکیبات فنولیک در عصاره ۱۰۰g /٤/٥g معادل اسید گالیک به دست آمد. ٤٥ ترکیب در آنالیز GC-MS اسانس شناسایی شد که سیس پیپریتون اپوکسید، پولگون و پیپریتنون اکسید ترکیبات اصلی آن را تشکیل می‌دادند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره نعناع به روش ارزیابی بتا-کاروتن/ اسید لینولئیک و ارزیابی ۲،۲-دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و فعالیت ضدمیکربی توسط روش ارزیابی دیسک-دیفوزیون و اندازه‌گیری حداقل غلظت لازم برای بازداری رشد اندازه گیری شد. اسانس نعناع فعالیت ضدمیکربی قابل توجهی در برابر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد، در حالی که عصاره متانولی تقریبا غیرفعال بود. از سوی دیگر عصاره متانولی نعناع فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به اسانس نعناع در بازداری سیستم رادیکال آزادDPPH و بتا-کاروتن/لینولئیک اسید نشان داده است. عصاره متانولی نعناع، باعث کاهش پایداری رادیکال آزاد DPPH با غلظتی از عصاره که ٥٠٪ بازداری را نشان می‌دهد (IC_{50}) معادل µg/ml ٥٥/٣ شد. در حالی که IC_{50} اسانس معادل µg/ml ۱۰٦۳۰ بود. در مقایسه با بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) که یک آنتی‌اکسیدان سنتزی است، اسانس و عصاره متانولی نعناع فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف‌تری نشان دادند. در سیستم بتا-کاروتن/ اسید لینولئیک ، اسانس و عصاره نعناع، قادر به بازداری اکسیداسیون اسید لینولئیک نبودند و در غلظت ۲mg/ml هر کدام به ترتیب ۲٤٪ و ۳٦٪ بازداری نشان دادند که بسیار پائین‌تر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی BHT بود.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکربی، نعناع

Antioxidant and antibacterial activity of the essential oil and methanol extract from *Mentha longifolia Hudson*

M Azizkhani[1*] and M Ataee[2]

Received: January 09, 2011 Accepted: January 04, 2012

[1] Lecturer, Khazar Institute of Higher Education and Ph.D Student, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[2] PhD Student, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[*] Corresponding author: E-mail: azizkhanim@vetmed.ut.ac.ir

Abstract

This study was designed to evaluate antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract from *Mentha longifolia hudson*. Total phenolic constituent of the extract was 4.5 g/100 g as gallic acid equivalent. GC–MS analysis of the oil resulted in the identification of 45 constituents, *cis*-piperitone epoxide, pulegone and piperitenone oxide being the main components. Antioxidant activity was evaluated through 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and β-carotene/linoleic acid assay. The essential oil and methanol extract were individually tested by disc-diffusion assay and evaluating minimum inhibition concentration against a number of bacteria. The essential oil showed strong antimicrobial activity against bacteria tested whereas the methanol extract almost remained inactive. In contrast, the extract showed much better activity than the essential oil in antioxidant activity assays employed, e.g. in the inhibition of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and β-carotene/linoleic acid systems. In the former, the extract was able to reduce the stable free radical DPPH with an IC_{50} of 55.3 μg/ml while that of the oils was 10630 μg/ml. When compared to BHT, a synthetic antioxidant, both showed weaker antioxidative potential. Similarly, in β-carotene/linoleic acid assay, these samples were not effectively able to inhibit the linoleic acid oxidation; exhibiting only 24% and 36% inhibitions at 2 mg/ml, respectively; both were far below than that of BHT.

Keywords: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Mentha longifolia hudson

مقدمه

جنس *Mentha L. (Lamiaceae)* شامل بیش از ۲۵ گونه است که در نقاط مرطوب و در اکثر نواحی آب و هوایی آسیا، اوراسیا، استرالیا و افریقای جنوبی می‌روید (لانگ و کورتو ۱۹۹۹). سه گونه نعناع شامل *M. piperita L. (peppermint)* و *M. arvensis L.* و *M. spicata L. (spearmint)* جهت تولید اسانس که در صنعت قنادی و عرقیات، به عنوان طعم دهنده به کار می‌رود یا مصارف دارویی دارد، در سراسر دنیا کشت می‌شود (لین و همکاران ۱۹۹٤؛ ایسکان و همکاران ۲۰۰۲؛ مورنو و همکاران ۲۰۰۲). برگ، گل و ساقه گیاه نعناع به عنوان چای یا افزودنی در مخلوط‌های ادویه جات برای کاربرد در بسیاری از مواد غذایی جهت ایجاد آروما و طعم به کار می‌رود (کوتاری و سینگ ۱۹۹۵؛ مورنو و همکاران ۲۰۰۲). علاوه بر این، نعناع در طب سنتی جهت درمان تهوع، برونشیت، بی‌اشتهایی و ناراحتی‌های کبدی به علت دارا بودن خاصیت ضدالتهابی، بادشکن، ضد قی، ضد اسپاسم و محرک بودن و بسیاری ویژگی‌های دیگر به کار می‌رود (کوآن ۱۹۹۹؛ ایسکان و همکاران ۲۰۰۲؛ مورنو و همکاران ۲۰۰۲). فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکربی اسانس یا عصاره‌های بعضی از گونه‌های نعناع مانند

M. spicata, M. piperita ،M.arvensis ،M. rotundifolia ،M. suaveolens و *M.pulegium* اثبات شده است (اکونومو و همکاران ۱۹۹۱؛ دفررا و همکاران ۲۰۰؛ کوآر و همکاران ۲۰۰۲). در سال‌های اخیر، مقاومت دارویی و شیمیایی در میکروارگانیسم‌های بیماریزای انسان و دام به وجود آمده است که علت آن استفاده از ترکیبات شیمیایی و داروهای ضدمیکربی تجاری در درمان بیماری های عفونی می‌باشد (دیویس ۱۹۹٤؛ سرویس ۱۹۹۷). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از آغاز و پیشرفت فساد اکسیداتیو و افزایش عمر نگهداری مواد غذایی حاوی چربی ضروری است. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی شیمیایی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و ترت بوتیل هیدروکینون (TBHQ) به طور گسترده‌ای در مواد غذایی به کار می‌رفتند اما به تدریج مشاهده شد که این ترکیبات دارای معایبی همچون فراریت زیاد و عدم پایداری در دماهای بالا هستند. مشکلات مربوط به سمی بودن احتمالی و جذب و تجمع آنها در اندام‌ها و بافت‌های بدن نیز مطرح شد و در آزمایشات انجام شده بر روی حیوانات سمی بودن این آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تائید گردید (گانستون ۲۰۰۲؛ رابینسون و سوالت ۲۰۰۵). از سوی دیگر، بیماری‌های غذازاد هنوز مشکل اصلی در دنیا و حتی در کشورهای پیشرفته و توسعه یافته می‌باشد (مید و همکاران ۱۹۹۹). فساد مواد غذایی حاصل از میکروارگانیسم‌ها نیز مهمترین نگرانی تولیدکنندگان و مصرف کنندگان می‌باشد. آلودگی مواد غذایی خام یا فرایند شده طی مراحل مختلف تولید تا فروش و توزیع رخ می‌دهد. بنابراین، درحال حاضر، در صنعت غذا از مواد نگهدارنده شیمیایی برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی استفاده می‌شود(دیک و بوکات ۱۹۹٦؛ مید و همکاران ۱۹۹۹؛ آلزرکی و ناکاهارا ۲۰۰۳). لذا، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضدمیکربی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی نعناع گونه*longifolia hudson* جمع آوری شده از بابل، منطقه شمال ایران، در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاه نعناع در مرحله گل دهی از روستاهای اطراف بابل، شمال ایران، جمع آوری شد و گونه گیاه توسط بخش فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران، تائید شد. برگ‌های گیاه از ساقه جدا و در سایه خشک و در آسیاب با مش ۲mm خرد شد.

تهیه اسانس

اسانس مواد گیاهی خشک و خردشده نعناع به روش تقطیر با بخار با استفاده از دستگاه کلونجر[1] مطابق دستورالعمل یوروپین فارماکوپیا[2] به مدت ۳ ساعت استخراج شد (بازده ml/100g ۲/۳۰) و بعد از صاف کردن و آبگیری با استفاده از سولفات سدیم تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای تیره در بسته در ٤°C نگهداری شد.

آنالیز اسانس

پس از تهیه اسانس، آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Trace GC 2000 FINNIGAN (انگلستان) بوده و ویژگی‌های آن عبارت بود از: ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیم ml/min ۱/۵ بود. همچنین، طیف سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با

1. Clevenger
2. European Pharmacopia

انرژی یونیزاسیون۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتیگراد انجام شد.

تهیه عصاره متانولی(MeOH)

بخشی از مواد گیاهی (۵۰ گرم) به طور متوالی توسط۱ لیتر متانول (مرک آلمان[1]) با استفاده از یک استخراج کننده سوکسله (ایزولب آلمان) به مدت ۷۲ ساعت در دمای زیر نقطه جوش حلال تحت استخراج قرار گرفت (لین و همکاران ۱۹۹٤). عصاره متانولی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. با استفاده از تبخیرکننده روتاری (بوچی فلاویل سوئیس[2]) در ٤۰°C تغلیظ شد و تا زمان استفاده در ٤°C نگهداری شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی DPPH

توانایی هیدروژن دهندگی عصاره‌ها، به واسطه بی رنگ نمودن محلول متانولی ارغوانی رنگ DPPH اندازه‌گیری شد. در این ارزیابی طیف سنجی، از رادیکال پایدار دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) (سیگما آلدریخ) به عنوان عامل واکنش دهنده استفاده شد (کوئندت و همکاران ۱۹۹۷؛ بورتیس و بوکار ۲۰۰۰؛ آدامز ۲۰۰۱). غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در متانول (۵۰µl) به ۵ml محلول متانولی ۰/۰۰٤٪ DPPH افزوده شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب در طول موج ۵۱۷ nm در مقایسه با شاهد قرائت شد. بازداری رادیکال آزاد DPPH بر اساس درصد (I٪) به صورت زیر محاسبه شد:

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

که A_{blank} جذب محلول شاهد (حاوی همه مواد واکنشگر به جز ترکیب مورد آزمایش) و A_{sample} جذب محلول حاوی ترکیب مورد آزمایش است. غلظتی از عصاره که ۵۰٪ بازداری را نشان می‌دهد (IC_{50}) از منحنی ترسیم شده بر اساس درصد بازداری در برابر غلظت عصاره به دست آمد. آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نیز به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد.

ارزیابی بتا-کاروتن/ اسید لینولئیک

در این آزمایش، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از طریق اندازه‌گیری ترکیبات آلی فرار و هیدروپراکسیدهای دی ان کنژوگه حاصل از اکسیداسیون اسید لینولئیک تعیین شد (داپکشیوز و همکاران ۱۹۹۸). محلول استوک بتا-کاروتن/ اسید لینولئیک (سیگما آلدریخ[3]) به صورت زیر تهیه شد: در ابتدا، ۰/۵mg بتا -کاروتن در ۱ml کلروفرم (با درجه خلوص HPLC) حل شد. سپس ۲۵µl لینولئیک اسید و ۲۰۰mg از توین ٤۰ [4] (مرک آلمان) به آن افزوده شد. کلروفرم با استفاده از تبخیرکننده تحت خلاء (بوچی فلاویل سوئیس) تبخیر شد. ۱۰۰ml آب مقطر اشباع شده با اکسیژن (۳۰ دقیقه، ۱۰۰ml/ min) با تکان دادن شدید افزوده شد. محلول آبی این مخلوط (۲/۵ml) به لوله‌های آزمایش منتقل و ۳۵۰µl از عصاره‌ها (۲ گرم در لیتر اتانول) به لوله‌ها افزوده شد، سپس در دمای اتاق به مدت ٤۸ ساعت نگهداری شد. مراحل ذکر شده در بالا در همان غلظت‌ها و یک شاهد (تنها ۳۵۰µl اتانول) با BHT تکرار شد. پس از گرمخانه گذاری، جذب در ٤۹۰nm قرائت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه ها با BHT و شاهد مقایسه شد.

ارزیابی ترکیبات فنولیک تام

سنجش مواد فنولیک تام در عصاره نعناع با استفاده از روش‌های ذکر شده در متون با واکنشگر فولین کیوکالتو[5] و اسید گالیک (هر دو از سیگما آلدریخ تهیه شد) به عنوان استاندارد انجام شد (چندلر و دادز ۱۹۸۳؛ اسلنکارد و سینگلتون ۱۹۹۷؛ داپکشیوز و همکاران ۱۹۹۸). ۰/۱ ml از محلول عصاره حاوی ۱mg عصاره به ارلن مایر منتقل شد، ٤٦ml آب مقطر و ۱ml واکنشگر فولین کیوکالتو به آن اضافه شد و محتویات ارلن مایر

1. Merck
2. Buchi Flawil
3. Sigma Aldrich
4. ween 40
5. Folin-Ciocalteu

به شدت مخلوط شد. بعد از ۳ دقیقه، ۳ml از محلول۲٪ کربنات سدیم اضافه شد و مخلوط به مدت ۲ ساعت روی صفحه تکان دهنده با شدت متوسط قرار داده شد. سپس جذب آن در ۷٦۰ nm قرائت شد. مراحل ذکر شده برای محلول های استاندارد اسید گالیک (۱۰۰۰µg–۰ در ۰/۱ml) انجام شد و یک منحنی استاندارد مطابق معادله زیر به دست آمد:

۰/۰۰۳۳ + اسیدگالیک (µg) × ۰/۰۰۱۲ = میزان جذب

فعالیت ضدباکتریایی

سویه‌های باکتریایی

تاثیر ضدمیکربی اسانس و عصاره نعناع بر ٦ باکتری باسیلوس سوبتیلیس ATCC-6633، انتروکوکوس فکالیس ATCC-29122، اشرشیاکلی A1 ، استافیلوکوکوس اورئوس A215، سالمونلا انتریتیدیس IK27 و استافیلوکوکوس اپیدرمیس A233 مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی دیسک-دیفوزیون

عصاره‌های گیاهی خشک شده تا رسیدن به غلظت ۳۰mg/ml در متانول حل شد و به روش فیلتراسیون با صافی ۰/٤٥ µm، استریل شدند. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره و اسانس به روش دیسک-دیفوزیون انجام شد (مورای و همکاران ۱۹۹۵). در این آزمایش ۱۰۰ µl سوسپانسیون حاوی 10^8 cfu/m باکتری روی آگار مغذی پخش شد. دیسک‌های (قطر٦mm) آغشته به ۱۰ µl اسانس یا ۳۰mg/ml عصاره (۳۰µg در هر دیسک) روی آگار تلقیح شده قرار داده شد. کنترل منفی با استفاده از حلال‌های مشابه برای تهیه عصاره‌های گیاهی تهیه شد. افلکساسین[1] (۱۰µg در هر دیسک) و سولباکتام[2] (۳۰ µg) + سفوپرازون[3] (۷۵ µg) (۱۰۵ µg در هر دیسک) به عنوان استاندارد مرجع مثبت برای تعیین حساسیت هر سویه به کار رفت.

پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷°C نگهداری شدند. فعالیت ضدباکتریایی از طریق اندازه-گیری منطقه بازداری در برابر باکتری‌های مورد آزمایش تعیین شد. هر آزمایش با ۲ بار تکرار انجام شد (گولوس و همکاران ۲۰۰۷).

اندازه‌گیری حداقل غلظت لازم برای بازداری رشد (MIC)

حداقل غلظت بازداری رشد (MIC) برای سویه‌های باکتریایی حساس به اسانس و عصاره در ارزیابی دیسک- دیفوزیون بررسی شد. مایه تلقیح سویه‌های باکتریایی از کشت‌های براث ۱۲ ساعته تهیه شد و کدورت سوسپانسیون‌های باکتریایی تا کدورت ۰/۵ در مقایسه با استاندارد مک فارلند[4] تنظیم شد. اسانس نعناع در دی متیل سولفوکساید (DMSO)۱۰٪ حل شد. ابتدا تا بالاترین غلظت مورد آزمایش (۵۰۰µg/ml) رقیق سازی شد و سپس سریال‌های حاوی رقت دو برابر (دوبل) در دامنه غلظت ۷/۸ تا ۵۰۰µg/ml در لوله‌های آزمایش استریل ۱۰ میلی لیتری حاوی آبگوشت مغذی (نوترینت براث :NB) تهیه شد. مقدار MIC اسانس نعناع در برابر سویه‌های باکتریایی بر اساس روش رقت میکرو ول تعیین شد (گولوس و همکاران ۲۰۰٤a؛ گولوس و همکاران ۲۰۰٤b). پلیت‌های ۹٦ چاهکی با افزودن ۹۵µl آبگوشت مغذی (NB) و µl ۵ مایه تلقیح به هر چاهک، آماده سازی شد. µl ۱۰۰ از محلول‌های مادر (استوک) اسانس نعناع در غلظت۵۰۰ µg/ml به چاهک‌های ردیف اول افزوده شد. سپس۱۰۰ µl از سریال رقت‌ها به شش ردیف متوالی از چاهک‌ها افزوده شد. آخرین ردیف حاوی ۱۹۵µl آبگوشت مغذی بود. µl ۵ از مایه تلقیح به عنوان کنترل منفی در هر استریپ به کار رفت. حجم نهایی در هر چاهک۲۰۰ µl بود. پلیت-ها با یک روکش استریل پوشانده شدند. از ماکسیپایم[5] در دامنه غلظت ۷/۸ تا ۵۰۰µg/ml در آبگوشت مغذی به

1. Ofloxacin
2. Sulbactam
3. Cefoperazone
4. Mc Farland
5. Maxipime

عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محتویات چاهک‌ها با تکان دادن آرام مخلوط شد و سپس در دمای ۳۷°C به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. رشد میکربی با قرائت جذب در ٦۰۰nm تعیین شد. MIC به عنوان حداقل غلظت ترکیبات جهت بازداری رشد باکتری‌ها تعریف می‌شود.

آنالیز آماری

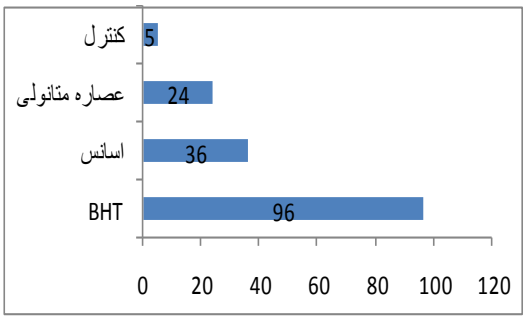
داده‌های تجربی با استفاده از نرم افزار SPSS 12.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف میان داده‌ها با استفاده از آزمون independent Student t-test تعیین و $P<۰/۰۵$ از لحاظ آماری قابل ملاحظه تلقی شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه، فعالیت جذب رادیکال آزاد و جلوگیری از اکسیداسیون لیپید توسط نعناع گونه *longifolia hudson* مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت جذب رادیکال آزاد توسط عصاره نعناع طی آزمایشDPPH اندازه گیری شد، با افزایش غلظت اسانس واکنش جذب رادیکال آزاد شدت می‌یابد. غلظت‌هایی از عصاره که ۵۰٪ بازداری (IC_{50}) را نشان می‌دهند در جدول ۱ آمده است. فعالیت بازدارندگی عصاره نعناع در جذب رادیکال آزاد نسبت به اسانس نعناع (IC_{50}= ۵۵/۳ µg/ml) بیشتر بود. این فعالیت ممکن است مربوط به وجود ترکیبات فنولیک مانند اسیدهای فنولیک همچون اسید رزمارینیک و پلی فنل‌ها باشد (کوئینی و همکاران ۱۹۹۵؛ میمیکا و همکاران ۱۹۹۹؛ جایمند و رضائی ۲۰۰۲؛ غلامی و همکاران ۲۰۰۲؛ منفرد و همکاران ۲۰۰۲؛ گولوس و همکاران ۲۰۰٤a؛ گولوس و همکاران ۲۰۰٤b؛ گولوس و همکاران ۲۰۰۷). لذا، احتمالا میزان ترکیبات فنولیک در عصاره متانولی بیشتر از اسانس است. در خصوص فعالیت بازداری در آزمایش لینولئیک اسید، عصاره متانولی و اسانس، هیچ کدام قادر به بازداری اکسیداسیون لینولئیک اسید به میزان قابل ملاحظه نبودند و در غلظت۲mg/ml به ترتیب ۲٤٪ و ۳٦٪ بازدرای نشان دادند که از کنترل مثبت (BHT) در غلظت مشابه، بسیار فاصله داشت (شکل۱).

جدول ۱- تاثیر عصاره متانولی و اسانس نعناع و BHT بر جذب رادیکال آزاد (DPPH)

نمونه	IC_{50} (µg/ml)
عصاره متانولی	۵۵/۳±۰/۵
اسانس	۱۰٦۳۰±۵/۰
BHT	۱۹/۸±۰/۵



شکل ۱- فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس *نعناع* که به صورت درصد بازداری در ارزیابی بتا-کاروتن/ لینولئیک اسید

با وجود اینکه عصاره متانولی و اسانس تاثیر بازدارندگی ضعیفی بر اکسیداسیون لینولئیک اسید نشان دادند، اما عصاره در جذب رادیکال آزاد، احتمالا به علت دارا بودن ترکیبات فنولی بیشتر، نسبت به اسانس فعالیت بیشتری نشان داد.

جدول ۲- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نعناع

ردیف	ترکیب	مقدار (٪)	ردیف	ترکیب	مقدار (٪)
۱	a-Pinene	۰/۱۵	۲٤	Bornyl acetate	۰/٤
۲	B-Pinene	۰/۱۵	۲۵	Sabinyl acetate	۰/۳
۳	B-Myrcene	۰/۱	۲٦	Thymol	٦/۲
٤	3-Octanol	۰/۱	۲۷	Carvacrol	۰/۷
۵	a-Terpinene	۰/۱	۲۸	Piperitenone	۱/۱
٦	*p*-Cymene	۰/٤۵	۲۹	Thymol acetate	۱/۲
۷	Limonene	۰/۳۳	۳۰	Piperitenone oxide	۱۵
۸	*(Z)*b-Ocimen	۰/۱۹	۳۱	b-Bourbonene	۰/۱
۹	*(E)*b-Ocimen	ناچیز	۳۲	Nepetalactone	۰/۷
۱۰	γ-Terpinene	۰/۷٦	۳۳	b-Caryophyllene	۳/۱
۱۱	cis-Sabinene hydrate	۰/۳	۳٤	b-Copaene	ناچیز
۱۲	Linalool	۰/۲	۳۵	a-Caryophyllene	۰/۵
۱۳	Camphor	۱/٦	۳٦	γ-Muurolene	۱/۳
۱٤	Menthone	٦/۸	۳۷	Bicyclogermacrene	۰/۳٦
۱۵	Isomenthone	٦/٦	۳۸	b-Bisabolene	۰/۲۵
۱٦	Pinocamphone	۰/۲۷	۳۹	γ -Cadinene	ناچیز
۱۷	Terpinen-4-ol	۰/۵٤	٤۰	d-Cadinene	۰/۲۲
۱۸	a-Terpineol	۰/٤	٤۱	Spathulenol	۰/۷۱
۱۹	Dihydro carvone	۰/٤	٤۲	Caryophyllene oxide	۰/۵۵
۲۰	Pulegone	۱٦/۳	٤۳	Salvial-4(14)-en-1-one	ناچیز
۲۱	Carvone	٤/۵	٤٤	b-Atlantol	ناچیز
۲۲	cis-Piperitone epoxide	۱۸/۸	٤۵	Humulene epoxide II	ناچیز
۲۳	trans-Piperitone epoxide	۵/٤	٤٦	کل	۹٦/۱۲

مطابق نتایج GC/MS، ترکیب اصلی اسانس نعناع شامل سیس پیپریتون اپوکسید [1](۱۸/۸٪)، پولگون[2] (۱٦/۳٪)، پیپریتنون اکسید[3] (۱۵٪)، منتون[4](٦/۸٪)، ایزومنتون[5] (٦/٦٪) و تیمول[6](٦/۲٪) است (جدول ۲). در مطالعه گولوس و همکاران (۲۰۰۷) نیز ترکیب اصلی اسانس نعناع (*Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*) مشابه آنالیز اسانس مطالعه حاضر بوده است. گزارش شده که اسانس بعضی گونه‌های نعناع حاوی درصد بالایی از کارون و دهیدروکارون (کوکینی و همکاران ۱۹۹۵؛ منفرد و همکاران ۲۰۰۲) و برخی دیگر شامل مقدار زیادی پیپریتنون اکسید و پیپریتون اکسید بوده‌اند (غلامی و همکاران ۲۰۰۱؛ جایمند و رضایی ۲۰۰۲). از لحاظ ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و مقدار آنها در میان مطالعات مختلف، نتایج این مطالعه با مشاهدات غلامی و همکاران (۲۰۰۱) و جایمند و رضایی (۲۰۰۲) مشابه بوده است. فعالیت ضدمیکربی اسانس و

1. Ccis-Piperitone epoxide
2. Pulegone
3. Piperitenone oxide
4. Menthone
5. Isomenthone
6. Thymol

عصاره نعناع به صورت کمی و کیفی از طریق بررسی وجود یا عدم وجود منطقه بازداری و مقدار MIC مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- فعالیت ضدمیکربی اسانس *نعناع* در برابر سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش

میکروارگانیسم	عصاره متانولی		اسانس		آنتی بیوتیک‌ها	
	DD[b](mm)	MIC[d]	DD[c](mm)	MIC[d]	DD[a] (mm)	MIC[e] (max)
باسیلوس سوبتیلیس-ATCC-6633	–	–	۸	٦۱/۳۰	۲۸ (OXF)	٦۱/۳۰
انتروکوکوس فکالیس ATCC-29122	–	–	۱۲	٦۱/۳۰	۱۸(SCF)	۳۰/۰۵
اشرشیاکلی-A1	–	–	۱۸	۳۰/۰۵	۲۰(OXF)	٦۱/۳۰
استافیلوکوکوس اورئوس- A215	–	–	۲۱	۱٤/٤۲	۲۲(SCF)	۳۰/۰۵
استافیلوکوکوس اپیدرمیس-A233	–	–	۱۳	٦۱/۳۰	۱۲(SCF)	۱٤/٤۲
سالمونلا انتریتیدیس-IK27	–	–	۸	٦۱/۳۰	۲۷(SCF)	٦۱/۳۰

-: منطقه رشد و MIC قابل اندازه‌گیری وجود نداشت

[a] DD قطر دیسک دیفوزیون (mm)، OXF: Ofloxacin (دیسک/ ۱۰µg) و SCF : salbactum (۳۰µg) + cefperazone (۷۵ µg) (دیسک/ ۱۰۵µg)

[b] DD قطر منطقه بازداری (mm) اطراف دیسک‌های (٦mm) آغشته به دیسک/ ۳۰۰µg عصاره متانولی

[c] DD قطر منطقه بازداری (mm) اطراف دیسک‌های (٦mm) آغشته به دیسک/ ۱۰µg اسانس

[d] حداقل غلظت لازم جهت بازداری رشد (µg/ml)

[e] ترکیب Maxipime (µg/ml) که به عنوان آنتی‌بیوتیک مرجع در ارزیابی رقت میکرو ول به کار رفت

نتایج نشان می‌دهد که اسانس نعناع گونه *hudson longifolia* فعالیت ضدمیکربی قابل ملاحظه‌ای در برابر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. از سوی دیگر عصاره متانولی هیچ فعالیت ضدمیکربی نشان نداد (جدول۳). حداکثر منطقه بازداری و MIC برای سویه-های باکتریایی در دامنه ۲۱mm-۸ و µg/ml ٦۱/۳۰- ۱٤/٤۲ قرار داشت (جدول ۳). فعالیت ضدمیکربی اسانس نعناع در این مطالعه با درصد بالای سیس پیپریتون اپوکسید (۱۸/۸٪)، پولگون (۱٦/۳٪) و پیپریتنون اکسید (۱۵٪) در ارتباط است. فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی این ترکیبات در مطالعات قبلی گزارش شده است (کارامن و همکاران ۲۰۰۳؛ کیتیک و همکاران ۲۰۰۲؛ ساهین و همکاران ۲۰۰۱).

بر اساس داده‌های تحقیق، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اسانس فعالیت ضدباکتریایی بیشتر و وسیع‌تری در مقایسه با عصاره متانولی دارد. بر اساس دلائلی که در متون و مقالات ارائه شده است، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره ها و اسانس‌های گیاهی در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نشان می‌دهند (کونسنتینو و همکاران ۱۹۹۹؛ ساهین و همکاران ۲۰۰۲؛ کارامن و همکاران ۲۰۰۳). فعالیت ضدمیکربی انتخابی اسانس *Mentha longifolia hudson* به تفاوت در دیواره سلولی باکتری‌ها وابسته است (ساهین و همکاران ۲۰۰۲؛ کیتیک و همکاران ۲۰۰۲؛ کارامن و همکاران ۲۰۰۳). داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس *Mentha longifolia hudson* می‌تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی در برابر عوامل بیماریزای غذازاد و عوامل فساد مواد غذایی مانند اشرشیا کلی، انتروکوکوس، سالمونلا، استافیلوکوکوس‌ها و باسیلوس به کار رود.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داده است که *Mentha longifolia hudson* دارای ترکیباتی با ویژگی‌های ضدمیکربی و آنتی‌اکسیدانی است. انجام مطالعات آزمایشگاهی بر سیستم‌های زنده و جانوری جهت تائید

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکربی نعناع برای جلوگیری از اثرات سوء رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها و بافت‌های بدن و نیز کاربرد آن در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی نیاز است.

منابع مورد استفاده

Adams RP, 2002. Identification of essential oils components by gas chromatography lquadrupole mass spectroscopy. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.

Alzoreky NS and Nakahara K, 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International Journal of Food Microbiology 80: 223-230.

Burits M and Bucar F, 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytochemistry Research 14: 323-328.

Chandler SF and Dodds JH, 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum lacinitum*. Plant Cell Reports 2: 205-208.

Cosentino S, Tubereso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V and Arzedi E, 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in /Applied Microbiology 29: 130-135.

Cowan MM, 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12: 564-582.

Cuendet M, Hostettmann K and Potterat O, 1997. Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helvetica Chimica Acto 80: 1144-1152.

Daferera DJ, Ziogas BN and Polissiou MG, 2002. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea, Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection 22: 39-44.

Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA and Linssen PH, 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal of the Science of Food and Agriculture 77: 140-146.

Davis J, 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 264: 375-382.

Deak T and Beuchat LR, 1996. Handbook of Food Spoilage. Pp. 224. New York, USA: CRC press.

Economou KD, Oreopolou O and Thomopoulos CD, 1991. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. Journal of the American Oil Chemists' Society 68: 109-113.

Ghoulami S, Idrissi A and Fkih-Tetouani S, 2001. Phytochemical study of *Mentha longifolia* of Morroco. Fititerapia 72: 596-598.

Gulluce M, Adiguzel A, Ogutcu H, Sengul M and Sahin F, 2004a. Antimicrobial effects of *Quercus ilex* l. extract. Phytotherapy Research 18: 208-211.

Gulluce M, Sokman M, Sahin F, Sokman A and Ozer H, 2004b. Biological activities of essential oil and methanolic extract of Micromeria fruticosa (L) Druce spp. Serpyllifolia (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey. Journal of the Science of Food and Agriculture 84: 735-741.

Gulluce M, Sahin F, Sokman M, Ozer H, Daferera D and Sokman A, 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. *longifolia*. Food Chemistry 103: 1449-1456.

Gunston FD, 2002. Chemical and biological synthesis of fatty acids and lipids. Pp. 83-84. In: vegetabli oils in food technology. Oxford, Blackwell: CRC press.

Iscan G, Kirimer N, Kurkcuoglu M, Baser KHC and Demirci F, 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 3943-3946.

Jaimand K and Rezaee MB, 2002. Chemical constituents of essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Hudson var. asiatica (Boriss.) Rech. F. from Iran. Journal of Essential Oil Research 14: 107-108.

Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M and Addiguzel A, 2003. Antimicrobial activity of aqueoua and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. Journal of Ethnopharmacology 85: 231-235.

Kaur C and Kapoor HC, 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science and Technology 37: 153-161.

Kitic D, Jovanovic T, Ristic M, Palic R and Stojanovic G, 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepata* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball from Montenegro. Journal of Essential Oil Research 14: 150-152.

Kokkini S, Karousou R and Lanaras T, 1995. Essential oils of spearmint (Carvon-rich) plants from the island of Crete (Greece). Biochemical Systematics and Ecology 23: 425-430.

Kothari SK and Singh UB, 1995. The effect of row spacing and nitrigen fertilization on scotch spearmint (*Mentha gracilis* Sole). Journal of Essential Oil Research 7: 287-297.

Lang BM and Croteau R, 1999. Genetic engineering of essential oil production in mint. Current Opinion in Plant. Biotechnology 2: 139-144.

Lin J, opoku AR, Geheeb-Keller M, Hutchings AD, Terblanche SE and Jager AK, 1999. Perliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. Journal of Ethnopharmacology 68: 267-274.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Breese JS and Shapiro C, 1999. Food related illness and dead in the United States. Emerging Infectious Diseases Journal 5: 607-625.

Mimica-Dukic N, Popovic M, Jakovljevic V, Szabo A and Gasic O, 1999. Pharmacological studies of *Mentha longifolia* phenolic extracts II. Hepatoprotective activity. Pharmaceutical Biology 37: 221-224.

Monfared A, Nabid MR and Rustayianh A, 2002. Composition of a carvone chemotype of *Mentha longifolia* (L.) huds. From Iran. Journal of Essential Oil Research 14: 51-52.

Moreno L, Bello R, Primo-Yufera E and Esplugues J, 2002. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. Phytotherapy Research 16:10-13.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Yolke RH, 1995. Manual of Clinical Mic. Pp.1773. 7th ed. Washington, DC: ASM.

Robinson K and Sewalt V, 2005. Extending freshness with rosemary extract. Information 16: 534-535.

Sahin F, Karaman I, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M and Adiguzel A, 2002. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. Journal of Ethnopharmacology 87: 61-65.

Service RF, 1995. Antibiotics that resist resistance. Science 270: 724-727.

Slinkard K and Singleton VL, 1997. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 28: 49-55.