

Extracting the essential oil of *Mentha longifolia* plant flower and leave by methods of steam distillation and hydrodistillation & investigating their antioxidant and antimicrobial properties

Yasaman Khojasteh¹, Mohammad Mehdi Afsahi^{2✉}, Mahboobe Raeeszadeh³

1. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Shahid Bahonar, Kerman, Iran. E-mail: yasaman.khojasteh@eng.uk.ac.ir
2. Corresponding author, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Shahid Bahonar, Kerman, Iran. E-mail: afsahi@uk.ac.ir
3. Department of Traditional Pharmacy, Faculty of Iranian Medicine, University of Medical Sciences, Kerman, Iran. E-mail: m.raeeszadeh@kmu.ac.ir

Article Info

Article type: research paper

Article history:

Received: 18 August 2024

Received in revised form:

8 December 2024

Accepted: 26 January 2025

Published online 18 June 2025

Keywords:

Essential oil
Mentha longifolia
Antimicrobial and antioxidant
properties
Hydrodistillation
Steam distillation

ABSTRACT

Objective: *Mentha longifolia*, from the *Lamiaceae* family, is one of the most widely used medicinal plants. This study aims to investigate the composition, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) of five bacterial strains, as well as the antioxidant capacity of essential oil obtained from *Mentha longifolia* flowers and leaves using the steam distillation (SD) method, and compare it with the conventional hydrodistillation (HD) method.

Materials and methods: First essential oils from *Mentha longifolia* flowers and leaves were extracted using SD and HD methods. Then antioxidant activity of the extracted oil using the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical inhibition method, and antimicrobial properties by assessing the MIC and MBC of 5 bacterial strains using the broth microdilution method were investigated, and the essential oil compositions of *Mentha longifolia* flowers and leaves were identified using gas chromatography-mass spectrometry.

Results: The yield of essential oil extraction for *Mentha longifolia* flowers and leaves using the SD method was $0.9915 \pm 0.0909\%$ and $1.6361 \pm 0.0346\%$, respectively, and for the HD method, it was $1.035 \pm 0.130\%$ and $1.6503 \pm 0.0186\%$, respectively, based on the weight of essential oil to the weight of the dry raw material. The IC₅₀ values (Half maximal inhibitory concentration) for antioxidant activity for *Mentha longifolia* leaves and flowers were 247.7 and 427.8, respectively, using the HD method, and 370.2 and 438.9 µg/mL using the SD method. MIC and MBC values for the flower oils were lower than those for the leaf oils, but there was no significant difference between the (SD, HD) methods for either the leaf or flower oils when the bacterial strains were the same. Pulegone was the main compound identified in both *Mentha longifolia* flowers and leaves.

Conclusions: According to the results, changes in HD and SD extraction methods had a significant effect on the antioxidant activity but had not significant effect on the antimicrobial activity of the flower and leaves of *Mentha longifolia* essential oils. In the same extraction methods, leaves essential oils exhibited stronger antioxidant activity, while flowers essential oils demonstrated stronger antimicrobial activity.

Citation khojasteh, Afsahi, Raeeszadeh (2025). Extracting the essential oil of *Mentha longifolia* plant flower and leave by methods of steam distillation and water distillation & investigating their antioxidant and antimicrobial properties, Journal of Separation Science and Engineering, 17(1), 13-36. <http://doi.org/10.22103/JSSE.2025.4693>



استخراج اسانس از گل و برگ گیاه پونه با روش تقطیر با بخار آب و تقطیر با آب و بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس استخراج شده

یاسمن خجسته^۱، محمدمهدی افصحی^۲، محبوبه رئیس زاده^۳

۱. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران. رایانامه: yasaman.khojasteh@eng.uk.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران. رایانامه: afsahi@uk.ac.ir

۳. گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب ایرانی، دانشگاه علوم پزشکی، کرمان، ایران. رایانامه: m.raeiszadeh@kmu.ac.ir

چکیده

هدف: پونه از خانواده *Lamiaceae* یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی است. هدف از این پژوهش بررسی ترکیبات تشکیل دهنده، حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ۵ سویه باکتری و ظرفیت آنتی اکسیدانی برای اسانس حاصل از گل و برگ پونه استخراج شده با روش تقطیر با بخار آب (Steam distillation) و مقایسه آن با روش مرسوم تقطیر با آب (HD:Hydrodistillation) می باشد.

مواد و روش: ابتدا اسانس گل و برگ پونه با روش SD و HD استخراج شد. سپس خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس استخراج شده با استفاده از روش مهار رادیکال های آزاد DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)، خاصیت ضد میکروبی با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ۵ سویه باکتری با روش رقیق سازی در چاهک بررسی و ترکیبات اسانس گل و برگ پونه با روش آنالیز کروماتوگرافی گازی - طیفسنجی جرمی شناسایی شد.

نتایج: بازده استخراج اسانس برای گل و برگ پونه در روش SD به ترتیب، 0.915 ± 0.09 و 0.346 ± 0.03 درصد و در روش HD به ترتیب برابر با 1.30 ± 0.13 و 1.86 ± 0.18 درصد برحسب وزن اسانس به وزن ماده اولیه خشک بدست آمد. همچنین با ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی مقدار IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) برای اسانس برگ و گل پونه در روش HD به ترتیب برابر $247/7$ و $427/8$ و در روش SD به ترتیب برابر $370/2$ و $438/9$ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. مقادیر MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و MBC (Minimum Bactericidal Concentration) اسانس های گل، کمتر از اسانس های برگ شد ولی این مقادیر برای دو نمونه اسانس (SD و HD) برگ یا دو نمونه اسانس (SD و HD) گل پونه، زمانی که سویه باکتری یکسان بود، تفاوتی با هم نداشتند. همچنین Pulegone اصلی ترین ترکیب شناسایی شده برای اسانس گل و برگ پونه بود.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج، تغییر در روش های استخراج HD و SD بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس های گل و برگ پونه تاثیرگذار و بر فعالیت ضد میکروبی آن ها تاثیری نداشت. در روش های استخراج یکسان، اسانس حاصل از برگ خاصیت آنتی اکسیدانی و اسانس حاصل از گل خاصیت ضد میکروبی قوی تری داشت.

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۸

دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۹/۱۸

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۷

انتشار: ۱۴۰۴/۰۳/۲۸

کلمات کلیدی:

اسانس

پونه

خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی

تقطیر با آب

تقطیر با بخار آب

استناد: خجسته، افصحی، رئیس زاده (۱۴۰۴). استخراج اسانس از گل و برگ گیاه پونه با روش تقطیر با بخار آب و تقطیر با آب و بررسی خواص

آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس استخراج شده، نشریه علوم و مهندسی جداسازی، (۱) ۱۷، ۳۶-۱۳.

<http://doi.org/10.22103/JSSE.2025.4693>



© نویسندگان

ناشر: دانشگاه شهید باهنر کرمان

۱-مقدمه

تاریخچه استفاده از عوامل ضد میکروبی غنی است و به تمدن‌های باستانی باز می‌گردد که در آن از عصاره‌های طبیعی مختلف برای مبارزه با عفونت استفاده می‌شد. برخی از این عصاره‌ها، که از گیاهان و کپک‌ها منشا می‌گیرند، حتی قبل از ابداع اصطلاح «آنتی‌بیوتیک‌ها»، خواص ضدباکتریایی داشتند [۱]. از زمان کشف پنی‌سیلین در سال ۱۹۲۸ توسط الکساندر فلمینگ^۱، تقریباً یک قرن است که از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود [۲]. تجاری سازی پنی‌سیلین در سال ۱۹۴۴ آمار مرگ و میر را برای کسانی که به عفونت‌های باکتریایی مبتلا شده بودند کاهش داد. در طول سال‌ها، گروه‌های متنوعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از منابع مختلف کشف و در یک محیط بالینی استفاده شده‌اند. با این حال، مکانیسم‌های مقاومت جدیدتر به طور مداوم همزمان با کشف یک ضد میکروب جدید ظاهر شده است. یکی از چالش‌های مهم مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سرعت کند توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید است. در سال‌های اخیر، میزان کشف ضد میکروب‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است [۳]. بسیاری از شرکت‌های بزرگ دارویی به دلیل سودآوری پایین این داروها، از تحقیق و توسعه آن‌ها کناره‌گیری کرده‌اند. همچنین برخلاف پیشرفت‌ها در این زمینه، سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در دهه‌های اخیر تکثیر شده‌اند [۴، ۵]. افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی منجر به اقامت طولانی‌تر در بیمارستان، هزینه‌های پزشکی بالاتر و افزایش نرخ مرگ و میر شده است [۶، ۷]. در طول سال‌ها، مطالعاتی بر روی متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند اسانس‌ها به امید کشف جایگزینی که بتواند چالش فعلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را کاهش دهد، انجام شده است [۸-۱۰]. اکثر اسانس‌ها با اثر بر غشای باکتری، اثرات آنتی‌بیوتیکی ایجاد می‌کنند [۶].

همچنین بیماری‌های ناشی از غذا در سرتاسر جهان خطر جدی بر سلامتی دارد. ایمنی و کیفیت فرآورده‌های غذایی می‌تواند توسط مواد مضر و میکروارگانیسم‌های مختلف به خطر بیفتد [۱۱]. امروزه در صنایع غذایی، حذف مواد نگهدارنده مصنوعی، مانند هیدروکسی تولوئن بوتیل^۲ (BHT) و هیدروکسی آنیزول بوتیل^۳ (BHA) از فرمولاسیون مواد غذایی و جایگزینی آن‌ها با نگهدارنده‌های طبیعی اهمیت قابل توجهی یافته است. از آنجایی که برخی از اثرات بالینی گیاهان دارویی و خوراکی ارتباط تنگاتنگی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی و به عنوان مکمل‌ها ممکن است بروز بیماری‌های مزمن مانند دیابت، سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش دهد. علاوه بر این، آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است در کند کردن پیشرفت بیماری آلزایمر که اغلب در بین افراد مسن در سراسر جهان دیده می‌شود، مرتبط باشند [۱۲]. به همین دلیل در سال‌های اخیر، تلاش زیادی برای کشف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بادوام و ایمن انجام شده است [۱۳]. گیاهان مختلف یک منبع ضروری و غنی از ترکیبات شیمیایی فعال دارویی هستند [۱۴-۱۷] و از زمان‌های قدیم برای نگهداری مواد غذایی و همچنین برای افزایش طعم آن‌ها استفاده می‌شوند.

¹ Alexander Fleming² butylated hydroxytoluene³ butylated hydroxyanisole

اخیراً، اسانس‌های استخراج شده از گونه‌های مختلف گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضدباکتری، نگهدارنده مواد غذایی و عوامل دارویی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۸].

اسانس‌ها، ترکیبات فرار گیاهان معطر هستند که در دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد تقطیر می‌شوند و عامل اصلی بو و طعم گیاهان هستند [۱۹]. اسانس‌های گیاهان معطر، به‌عنوان یک گروه فیتوشیمیایی مهم، سال‌هاست که منبع بزرگی از عوامل دارویی و افزودنی‌های غذایی می‌باشند. آن‌ها از قسمت‌های مختلف گیاه مانند گل‌ها، جوانه‌ها، دانه‌ها، برگ‌ها و میوه‌ها به دست می‌آیند و از مخلوطی از مونو و سسکوی‌ترین‌های فرار تشکیل شده‌اند [۲۰]. عوامل متعددی مانند آب و هوا، شرایط فصلی و جغرافیایی، دوره برداشت و تکنیک‌های استخراج بر ترکیب شیمیایی اسانس‌ها تأثیر می‌گذارد. بنابراین نیاز به مطالعه ترکیب شیمیایی اسانس‌ها وجود دارد، زیرا ارزش آن‌ها با ترکیب شیمیایی آن‌ها مرتبط است [۲۱]. همچنین کاربرد اسانس‌ها در بسیاری از زمینه‌ها، از جمله تولید عطر، گیاه درمانی، رایحه درمانی، لوازم آرایشی، ادویه‌ها و تغذیه، دانشمندان بسیاری را تشویق کرد تا گیاهان حاوی اسانس را در تحقیقات شیمیایی و دارویی مورد مطالعه قرار دهند [۲۲]. پونه یکی از این گیاهان دارویی است که کاربردهای فراوانی دارد. این گیاه عمدتاً برای درمان بیماری‌های رایج مانند سرفه، سرماخوردگی، گرفتگی معده، آسم، نفخ شکم، سوءهاضمه و سردرد استفاده می‌شود و در درمان زخم‌ها و غدد متورم نیز موثر است [۲۳، ۲۴].

گولوس و همکاران در سال ۲۰۰۷ [۲۵] و حاجولایی و همکاران در سال ۲۰۰۹ [۲۶] به منظور بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی پونه پژوهشی انجام دادند. آن‌ها دریافتند که اسانس، فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر میکروارگانیسم‌های آزمایش شده دارد در حالی که عصاره متانولی تقریباً غیر فعال بود. در مقابل، عصاره فعالیت بسیار بهتری نسبت به اسانس در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد. همچنین در مطالعات دیگر نیز مشخص شد این گونه دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی است [۲۷، ۲۸].

در پژوهشی اوکو و همکاران در سال ۲۰۱۱ [۲۹]، تأثیر روش‌های تقطیر با آب^۴ (HD) و استخراج بدون حلال با مایکروویو^۵ (SFME) بر ترکیب شیمیایی اسانس پونه را بررسی کردند. اصلی‌ترین ترکیبات بدست آمده از دو روش شامل منتون، آلفا پینن، پولگون و بتا پینن بود. اسانس بدست آمده از تقطیر با آب، اکتانول (۰/۲٪)، بی سیکلوژرماکرن (۰/۱٪) و اکسید کاریوفیلن (۰/۱٪) را نشان داد که در اسانس استخراج شده با مایکروویو بدون حلال یافت نشد.

هدف از این پژوهش بررسی ترکیبات تشکیل دهنده، حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ۵ سویه باکتری و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برای اسانس گل و برگ پونه استخراج شده با روش تقطیر با بخار آب^۶ (SD) و مقایسه آن با روش مرسوم HD می‌باشد. تا جایی که نویسندگان این مقاله اطلاع دارند در هیچ مطالعه‌ای تاکنون موارد ذکر شده برای اسانس حاصل از گل و برگ گیاه پونه به صورت مجزا بررسی نشده است.

⁴ Hydrodistillation

⁵ Solvent free microwave extraction

⁶ Steam distillation

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی

پونه مورد مطالعه در اواخر مردادماه سال ۱۴۰۲ از زیستگاه طبیعی آن واقع در ارتفاع ۲۸۲۰ متری کوه‌های روستای بیدخون از توابع شهرستان بردسیر استان کرمان جمع‌آوری شد (شکل ۱) و توسط کارشناسان در هرباریوم گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان، گونه آن شناسایی و تعیین گردید. سپس در غیاب نور و در دمای محیط خشک گردید.



شکل ۱. پونه مورد استفاده در این پژوهش

Figure 1: The *Mentha longifolia* used in this stud

۲-۲- مواد شیمیایی

متانول با فرمول شیمیایی CH_3OH با درصد خلوص ۹۹/۹ درصد، معرف MTT^7 ۰/۰۱ درصد، محیط کشت مولر هینتون پراث^۸، محیط کشت مولر هینتون آگار^۹، معرف DPPH^{10} ، توین^{۱۱} ۸۰ و پودر آسکوربیک اسید^{۱۲} (ویتامین ث) با فرمول $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ، همگی از شرکت مرک^{۱۳} آلمان و ۵ سویه باکتری استاندارد شامل آسینتوباکتر^{۱۴} (PTCC۱۷۵۷۵)، اشرشیاکلی^{۱۵} (PTCC۲۵۹۲۲)، سودوموناس آئروژینوزا^{۱۶} (PTCC۲۷۸۵۳)، استافیلوکوک اورئوس^{۱۷} (PTCC۲۵۹۲۳) و انتروکوکوس فکالیس^{۱۸} (PTCC۲۹۲۱۲) از موسسه انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

⁷ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

⁸ Mueller Hinton Broth

⁹ Mueller Hinton Agar

¹⁰ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

¹¹ Tween 80

¹² Ascorbic acid

¹³ Merck

¹⁴ *Acinetobacter*

¹⁵ *Escherichia coli* (E.coli)

¹⁶ *Pseudomonas aeruginosa*

¹⁷ *Staphylococcus aureus*

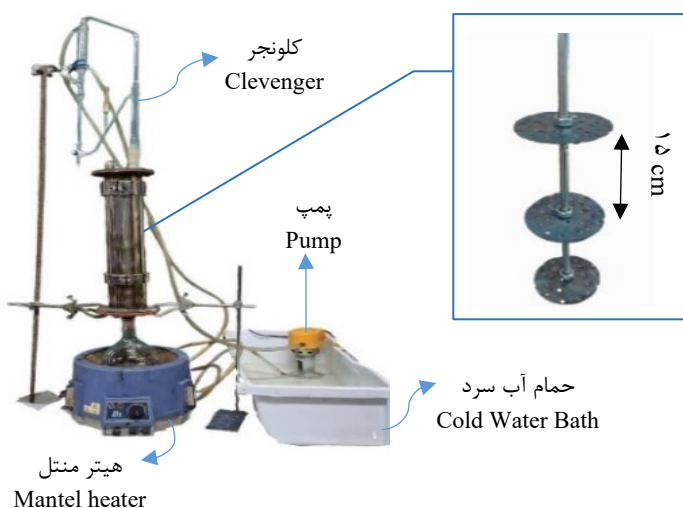
¹⁸ *Enterococcus faecalis*

۲-۳- آزمایش‌های اولیه

برای بررسی وجود اسانس در همه‌ی اندام‌های گیاه پونه، ۳ آزمایش با سه تکرار انجام شد. در هر آزمایش ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ۵۰ گرم از برگ، ساقه و گل پونه به صورت جداگانه اضافه شد و سپس استخراج اسانس به مدت ۲ ساعت به روش تقطیر با آب انجام گرفت. در ادامه اسانس بدست آمده به وسیله ترازو با دقت چهار رقم اعشار وزن و برای محاسبه بازده یادداشت شد.

۲-۴- استخراج اسانس از گل و برگ پونه به روش تقطیر با بخار آب (SD)

برای استخراج اسانس از گل و برگ پونه به روش تقطیر با بخار آب، یک آزمایش با سه تکرار با استفاده از چیدمان نشان داده شده در شکل ۲ انجام شد. این چیدمان دارای یک محفظه‌ی استوانه‌ای بود که درون آن سه سینی با منافذی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر قرار داشت و فاصله هر سینی با سینی دیگر، ۱۵ سانتی‌متر بود. برای جلوگیری از زنگ زدن، تمامی قسمت‌های فلزی به کار رفته در این چیدمان از جنس استیل انتخاب شد. در هر آزمایش، ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به داخل یک بالن ۲۰۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و بر روی هیترمنتل^{۱۹} قرار گرفت. سپس ۶۵ گرم از گل یا برگ پونه، بر روی سینی‌های درون محفظه‌ی استوانه‌ای ریخته شد و فرایند اسانس‌گیری به مدت سه ساعت انجام گرفت. استخراج و عملیات تقطیر به وسیله کلونجر^{۲۰} مطابق با فارماکوپه اروپایی انجام شد [۳۰]. در ادامه اسانس بدست آمده وزن و برای محاسبه بازده یادداشت شد. اسانس‌ها تا زمان انجام آنالیز و سایر آزمایش‌ها درون ظرف تیره و در یخچال نگهداری شدند.



شکل ۲. چیدمان مربوط به استخراج از گیاه پونه به روش تقطیر با بخار آب

Figure 2: The setup related to the extraction of *Mentha longifolia* by steam distillation method

¹⁹ Mantel heater

²⁰ Clevenger

۲-۵- استخراج اسانس از گل و برگ پونه به روش تقطیر با آب (HD)

برای استخراج اسانس از گل و برگ پونه به روش تقطیر با آب، یک آزمایش برای هر کدام با سه تکرار با استفاده از چیدمان نشان داده شده در شکل ۳ انجام شد. در هر آزمایش ۶۵ گرم از گل یا برگ پونه به همراه ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر به درون یک بالن ۲۰۰۰ میلی لیتری ریخته شد و بر روی هیترمنتل قرار گرفت و استخراج اسانس به مدت ۳ ساعت انجام شد. سپس اسانس بدست آمده وزن و برای محاسبه بازده یادداشت شد. اسانس ها تا زمان انجام سایر آزمایش ها درون ظرف تیره و در یخچال نگهداری شدند.



شکل ۳. چیدمان مربوط به استخراج از گیاه پونه به روش تقطیر با آب

Figure 3: The setup related to the extraction of *Mentha longifolia* by hydrodistillation method

۲-۶- محاسبه بازده:

مدت زمان کافی اختصاص داده شد تا دو فاز آبی و آلی به طور کامل از یکدیگر جدا شوند. سپس فاز آلی با دقت جدا شد و به عنوان اسانس توزین گردید. در هر آزمایش درصد بازده اسانس بر اساس وزن اسانس به وزن ماده اولیه خشک مطابق با رابطه (۱) تعیین شد:

$$Y(\%) = W_0 / W_i \times 100$$

(۱)

در رابطه (۱)، Y درصد بازده استخراج، W_0 وزن اسانس بدست آمده و W_i وزن ماده اولیه خشک می باشد.

۲-۷- ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش مهار رادیکال های آزاد DPPH

ظرفیت آنتی اکسیدانی چهار نمونه اسانس گل و برگ پونه بدست آمده با روش های استخراج SD و HD، از روش مهار رادیکال های آزاد DPPH تعیین گردید [۳۱]. برای این منظور ابتدا مقداری از هر نمونه در متانول حل شد و با غلظت سازی سریالی، غلظت های مختلف تهیه گردید. غلظت های مناسب برای هر نمونه (۶۲/۵ - ۱۰۰۰) میکروگرم بر میلی لیتر بود. ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف هر نمونه و ۱۵۰ میکرولیتر DPPH درون چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. همچنین یک چاهک حاوی ۱۵۰ میکرولیتر DPPH و ۵۰ میکرولیتر متانول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. در ادامه نمونه ها به مدت ۴۰ دقیقه در تاریکی و دمای محیط

گرماگذاری شد و با دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH برای نمونه ها و کنترل در غلظت های مختلف با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد و مقدار IC50 که غلظت مورد نیاز از هر نمونه برای مهار ۵۰ درصد از رادیکال های آزاد می باشد نیز با استفاده از نرم افزار آماری Prism نسخه ۸ محاسبه گردید. همچنین این مراحل برای ویتامین ث به عنوان یک استاندارد با فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه نیز انجام شد.

$$\% inhibition = ([A_{control} - A_{sample}] / A_{control}) \times 100 \quad (2)$$

در فرمول (۲)، $\% inhibition$ درصد مهار رادیکال های آزاد، $A_{control}$ میزان جذب کنترل و A_{sample} میزان جذب نمونه می باشد.

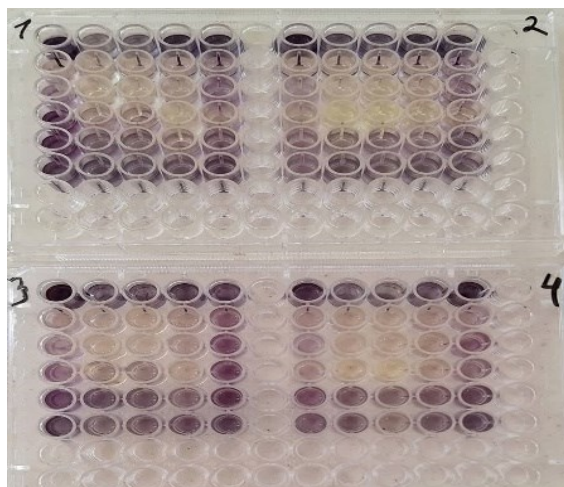
۲-۸- ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای ۵ سویه باکتری

فعالیت ضد میکروبی دو نمونه اسانس گل پونه و دو نمونه اسانس برگ پونه در برابر ۳ سویه باکتری گرم منفی آسینتوباکتر، اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و دو سویه باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس و انتروکوکوس فکالیس به روش رقیق سازی در چاهک مطابق با روش انجمن استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI)^{۲۱} انجام و مقدار MIC تعیین گردید [۳۲]. برای این منظور باکتری ها در محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت یک شبه داده شد و در دمای 37 ± 1 درجه سانتی گراد در انکوباتور، گرماگذاری شد. سپس باکتری ها در محیط کشت مولر هینتون برات (محیط کشت مایع) پخش شد تا کدورتی معادل نیم مک فارلند^{۲۲} (10^5 باکتری) از آن ها تهیه شود. همچنین مقداری از هر نمونه اسانس در مقدار مناسبی محیط کشت مولر هینتون برات حاوی ۵ درصد توپین ۸۰ حل شد و با استفاده از غلظت سازی سریالی، غلظت های (۱۰۰۰ - ۶۲/۵) میکروگرم بر میلی لیتر از نمونه ها تهیه گردید. در این روش از پلیت های ۹۶ خانه استفاده شد که درون چاهک های آن با ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف هر نمونه و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های نیم مک فارلند باکتری ها پر شد که با پیشروی در هر ردیف، سویه باکتری ها تغییر می کند و در هر ستون با ثابت ماندن نوع باکتری، غلظت های نمونه ها متغیر می باشد. (مطابق شکل ۴). همچنین ردیف اول، گروه کنترل مثبت است که شامل محیط کشت و باکتری بدون حضور اسانس می باشد. در ادامه نمونه ها ۲۴ ساعت در دمای $37/5$ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. در چاهک هایی که باکتری رشد کرده باشد کدورت وجود دارد و به منظور تشخیص بهتر به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر معرف MTT اضافه گردید. در هر چاهکی که باکتری رشد کرده باشد معرف از زرد به بنفش -

²¹ Clinical Laboratory Standards Institute

²² 0.5 McFarland

صورتی تغییر رنگ می‌دهد. بدین ترتیب می‌توان با توجه به تغییر رنگ چاهک‌ها، مقدار MIC^{23} را تعیین نمود. همچنین برای تعیین MBC^{24} از چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها رشد نکرده بود در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یک شبه داده شد و در صورت عدم رشد باکتری مقدار MBC تعیین گردید.



شکل ۴. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی (تعیین حداقل غلظت بازدارندگی) ۴ نمونه اسانس برای ۵ سویه باکتری

Figure 4: Evaluation of antibacterial activity (determination of minimum inhibitory concentration) of 4 essential oil samples against 5 bacterial strains

۹-۲- آنالیز کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی^{۲۵} (GC/MS)

آنالیز کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی، برای تعیین ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس گل و برگ پونه انجام گرفت. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Agilent 6890 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 بود. برای شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه که توسط n-هگزان رقیق شده بود به دستگاه GC/MS تزریق شد. برنامه دمایی ستون بصورت ذیل تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما و زمان پاسخ ۷۵ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق $290^{\circ}C$ بصورت split ۱ به ۳۵ بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون $220^{\circ}C$ بود. محدوده اسکن جرم‌ها از ۴۰ تا ۵۰۰ تنظیم گردید. نرم افزار مورد استفاده chemstation بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص

²³ Minimum Inhibitory Concentration

²⁴ Minimum Bactericidal Concentration

²⁵ Gas chromatography-mass spectrometry

بازدارندگی آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت.

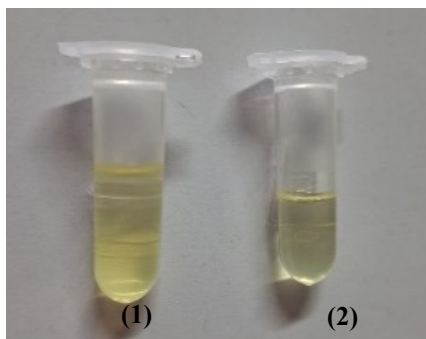
۲-۱۰ آزمون $T^{۲۶}$ برای مقایسه میانگین‌ها

برای مقایسه میانگین درصد بازدهی به دست آمده در قسمت ۲-۴ و ۲-۵ و مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بین دو روش مختلف برای گل و برگ پونه در قسمت ۲-۷ از آزمون T دو نمونه مستقل با استفاده از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۸ استفاده شد و با توجه به مقدار p-value معنی‌دار بودن اختلاف آن‌ها بررسی شد. برای p-value کمتر از ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آزمایش‌های اولیه

درصد بازدهی استخراج اسانس برای برگ و گل پونه به ترتیب $۰/۰۳۷۸ \pm ۱/۵۳$ و $۰/۰۶۳۱ \pm ۰/۹۶$ بدست آمد. با توجه به عدم مشاهده اسانس برای ساقه، این اندام برای تمامی آزمایش‌های این پژوهش حذف گردید. در ادامه تفاوت رنگ و حجم اسانس برگ و گل پونه در شکل ۵ به ازای ۵۰ گرم از هر یک نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود مقدار اسانس برگ بیشتر از گل و رنگ زرد آن پررنگ‌تر است.



شکل ۵. تفاوت رنگ و حجم اسانس مربوط به برگ (۱) و گل (۲) پونه به ازای ۵۰ گرم از هر کدام

Figure 5: Difference in color and volume of the essential oil obtained from 50 grams of *Mentha longifolia* leaves (1) and flowers (2)

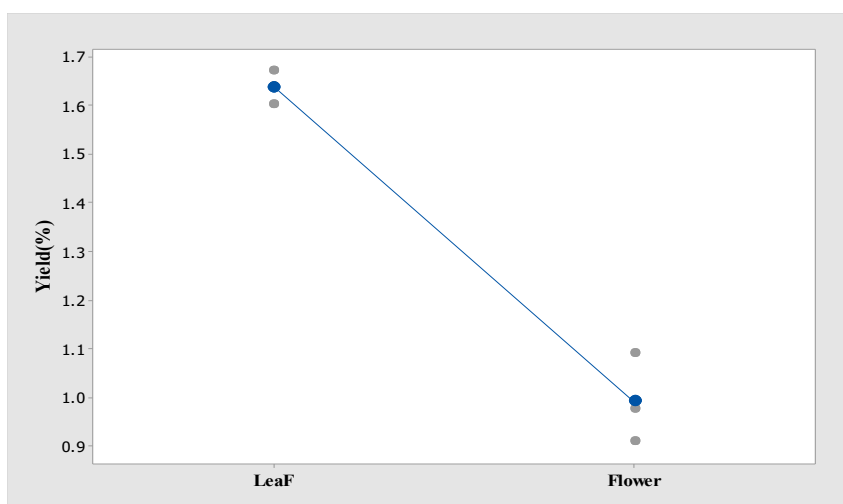
۳-۲- مقایسه استخراج اسانس حاصل از گل و برگ پونه به روش تقطیر با بخار آب (SD)

در این روش اولین قطرات اسانس حاصل از تقطیر پس از گذشت ۳۰ دقیقه از ابتدای آزمایش مشاهده شد. برای گل و برگ پونه درصد بازده استخراج اسانس به ترتیب برابر با 0.915 ± 0.099 و 0.346 ± 0.036 به دست آمد که با انجام آزمون T و نتایج حاصل از آن در جدول ۱ مشخص شد که میانگین درصد بازده استخراج دو اسانس با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد. در ادامه فاصله بین میانگین‌های درصد بازده دو نمونه اسانس در شکل ۶ مشاهده می‌شود.

جدول ۱. نتایج آزمون T برای میانگین درصد بازده اسانس گل و برگ پونه استخراج شده با روش SD

Table 1: Results of the T-test for the mean yield percentage of essential oil from *Mentha longifolia* flowers and leaves extracted by the SD method

P-Value	T-Value	Degree of freedom	95% confidence interval for the difference	Pooled StDev	Difference
0.000	11.49	4	(0.4888 , 0.8005)	0.0687	0.6446



شکل ۶. مقایسه درصد بازده برای اسانس حاصل از گل و برگ پونه در روش استخراج SD

Figure 6: Comparison of the yield percentage for the essential oil obtained from *Mentha longifolia* flowers and leaves using the SD extraction method

همچنین ترکیب شیمیایی اسانس گل و برگ پونه پس از تجزیه و تحلیل با GC-MS بدست آمد. در مجموع برای برگ ۱۳ ترکیب شناسایی شد که ۹۲/۸۸ درصد از کل اسانس را تشکیل می‌داد. این ترکیبات در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۲. ترکیبات اصلی شناسایی شده توسط GC-MS برای اسانس برگ پونه در روش تقطیر با بخار آب

Table 2: The main compounds identified by GC-MS for the essential oil of *Mentha longifolia* leaves in the hydrodistillation method

RT	Mass percent	Components	row
11.28	0.15	alpha.-Pinene	1
13.61	0.29	beta.-Pinene	2
14.78	0.19	Octanol <3->	3
16.32	0.34	Limonene	4
16.50	2.43	Eucalyptol	5
23.06	0.57	Menthone	6
23.38	0.89	Menthofuran	7
23.50	5.43	p-Menthan-3-one	8
23.90	0.26	Borneol	9
24.06	1.61	Dihydrocarvone trans	10
27.22	72.19	Pulegone	11
31.86	0.95	Piperitenone	12
32.84	7.58	Piperitenone oxide	13
	92.88	Total	

برای اسانس گل پونه نیز ۱۳ ترکیب شناسایی شد که ۹۲/۹۵ درصد از کل اسانس را تشکیل می‌داد. این ترکیبات در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول ۳. ترکیبات اصلی شناسایی شده توسط GC-MS برای گل پونه در روش تقطیر با بخار آب

Table 3: The main compounds identified by GC-MS for the flowers of *Mentha longifolia* in the hydrodistillation method

RT	Mass percent	Components	row
11.28	0.26	alpha.-Pinene	1
13.61	0.41	Sabinene	2
16.32	0.21	Limonene	3
16.50	2.64	Eucalyptol	4
23.37	1.24	Menthofuran	5
23.50	3.13	p-Menthan-3-one	6
23.90	0.41	Borneol	7
24.11	1.16	Dihydrocarvone trans	8
27.21	72.42	Pulegone	9
31.86	0.77	Piperitenone	10
32.84	9.49	Piperitenone oxide	11
34.96	0.21	Caryophyllene E	12
41.80	0.60	Caryophyllene oxide	13
	92.95	Total	

با توجه به جداول ۲ و ۳، درصد ترکیبات تشکیل دهنده دو اسانس با یکدیگر متفاوت است. ترکیبات Pulegone، Piperitenone، p-Menthan-3-one، Eucalyptol، Dihydrocarvone trans، Menthofuran و Piperitenone oxide

اصلی ترین اجزاء مشترک اسانس گل و برگ پونه شناسایی شده در این پژوهش می باشد که به ترتیب ۹۰/۸۵ و ۹۱/۰۸ درصد از کل ترکیبات را تشکیل می دهند. اسانس به دست آمده از برگ پونه سه ترکیب *Octanol* <3>. *beta*-.*Pinene* و *Menthone* را نشان داد که در گل پونه یافت نشد. همچنین سه ترکیب *Sabinene*، *Caryophyllene E* و *Caryophyllene* *oxide* فقط در گل پونه موجود بود. در روش تقطیر با بخار آب ترکیب *pulegone* در اسانس گل و برگ پونه به ترتیب ۷۲/۴۲ و ۷۲/۱۹ درصد از کل ترکیبات را تشکیل داد و به عنوان اصلی ترین ترکیب شناسایی شده معرفی گردید. این ترکیب در پژوهش های پیشین [۳۳-۳۵] برای مخلوطی از تمام اندام های هوایی گیاه پونه به عنوان ترکیب غالب بود، اما مقادیر آن به ترتیب ۵۴/۳۱، ۴۹/۴۳ و ۶۴/۷ درصد گزارش شده است که تفاوت قابل توجهی با نتایج این مطالعه دارد. همچنین در پژوهش های دیگر [۳۶، ۳۷] ترکیب کارون به ترتیب با فراوانی ۴۷/۳۹ و ۵۲/۸۱ درصد از کل ترکیبات به عنوان ترکیب غالب شناسایی شد که این نتایج نیز با یافته های تحقیق حاضر اختلاف دارد. این تفاوت ها می تواند به عواملی همچون شرایط محیطی، روش استخراج، اندام های مورد استفاده از گیاه و یا تفاوت های ژنتیکی در نمونه ها مرتبط باشد.

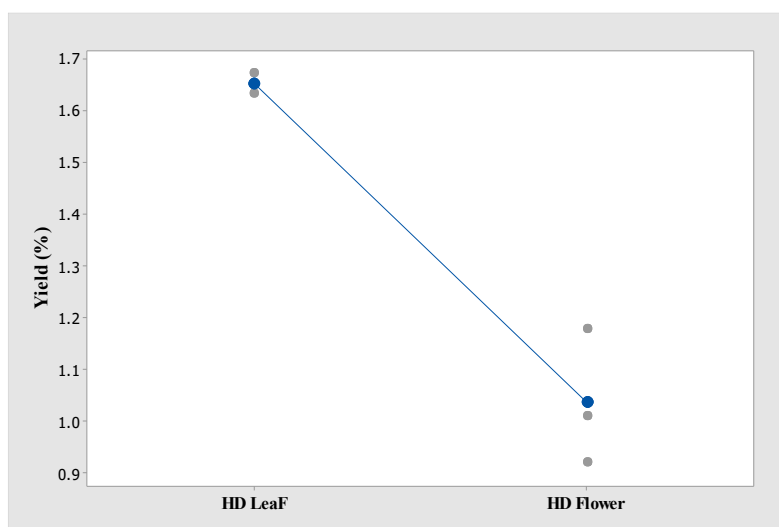
۳-۳- استخراج اسانس مربوط به گل و برگ پونه به روش تقطیر با آب (HD)

در این روش اولین قطرات میعان شده اسانس پس از گذشت ۲۲ دقیقه از ابتدای آزمایش مشاهده شد. کاهش این زمان برای HD قابل پیش بینی بود. زیرا در شرایط تقطیر با SD علاوه بر رساندن دمای آب به نقطه جوش، مدت زمانی در حدود ۸ دقیقه نیز برای گرم کردن برگ ها و گل های قرار گرفته بر روی سینی ها لازم بود. برای گل و برگ پونه درصد بازده استخراج اسانس به ترتیب برابر با 0.130 ± 0.035 و 0.186 ± 0.065 به دست آمد. با انجام آزمون T و مشاهده نتایج حاصل از آن در جدول ۴، اختلاف میانگین درصد بازده استخراج دو اسانس حاصل از گل و برگ پونه در این روش با ۹۵ درصد اطمینان معنی دار شد (p-value کمتر از ۰/۰۵). در ادامه فاصله بین میانگین های درصد بازده دو نمونه اسانس در شکل ۷ مشاهده می شود. در مطالعاتی دیگر [۲۹، ۳۸، ۳۹] اسانس پونه از مناطق مختلف را به روش تقطیر با آب استخراج کردند. مقدار بازده در این تحقیقات به ترتیب برابر با ۱/۵۲، ۰/۳۲ و ۰/۵۶ درصد برحسب وزن اسانس به وزن ماده اولیه خشک گزارش شده است که با یکدیگر تفاوت قابل توجهی دارند. تنوع در مقدار بازده برای روش استخراج یکسان می تواند ناشی از تاثیر شدید آب و هوا در مناطق مختلف باشد [۴۰].

جدول ۴. نتایج آزمون T برای میانگین درصد بازده اسانس گل و برگ پونه استخراج شده با روش HD

Table 4: Results of the T-test for the mean percentage yield of essential oil from *Mentha longifolia* flowers and leaves extracted using the HD method

P-Value	T-Value	Degree of freedom	95% confidence interval for the difference	Pooled StDev	Difference
0.001	8.13	4	(0.4049 , 0.825)	0.0926	0.615



شکل ۷. فاصله میانگین درصد بازده بین اسانس گل و برگ پونه در روش استخراج HD

Figure 7: The difference in the mean percentage yield between the essential oils of *Mentha longifolia* flowers and leaves in the HD extraction method

۳-۴- مقایسه دو روش استخراج HD و SD

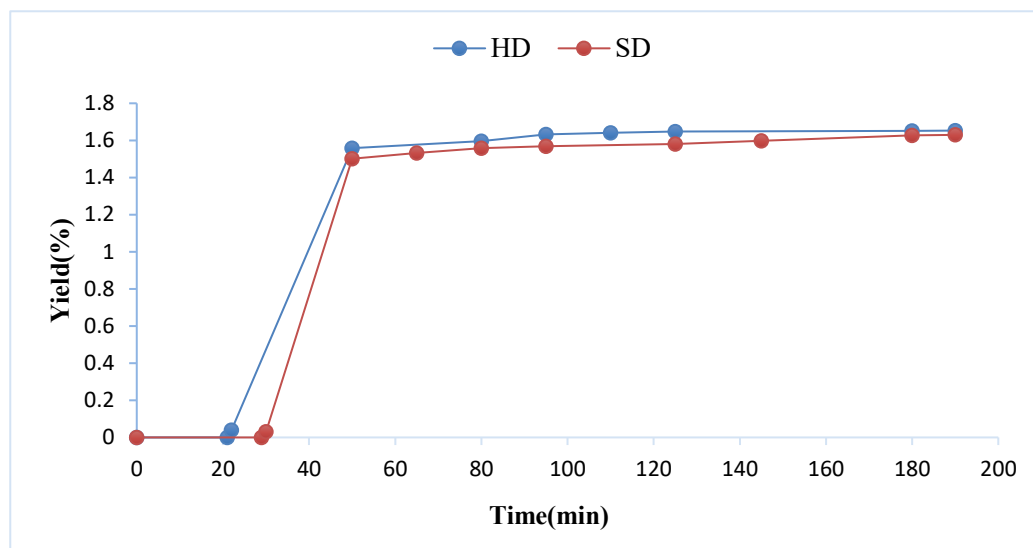
از نتایج گزارش شده در قسمت ۲-۳ و ۳-۳ مشاهده می‌شود که میانگین درصد بازده استخراج اسانس گل و برگ پونه در روش HD بیشتر از روش استخراج SD است. اما با انجام آزمون T و نتایج حاصل از آن در جدول ۵ مشخص شد که اختلاف میانگین بین دو نمونه اسانس گل یا دو نمونه اسانس برگ در دو روش متفاوت استخراج (SD و HD) با ۹۵ درصد اطمینان معنی‌دار نبود (p-value بیشتر از ۰/۰۵).

جدول ۵. نتایج آزمون T برای میانگین درصد بازده، بین دو اسانس گل و دو اسانس برگ پونه استخراج شده با روش‌های SD و HD
Table 5: Results of the T-test for the mean percentage yield between the two essential oils of *Mentha longifolia* flowers and leaves extracted using the HD and SD methods

P-Value	T-Value	Degree of freedom	95% confidence interval for the difference	Pooled StDev	Difference	
0.565	0.63	4	(-0.0488 , 0.0772)	0.0278	0.0142	Leaf
0.939	0.08	4	(-1.428 , 1.1515)	0.649	0.043	Flower

در شکل ۸ سینتیک استخراج اسانس از برگ پونه در دو روش استخراج HD و SD، نشان داده شده است. همانگونه که از این شکل مشخص است ۹۵/۶۰ درصد از کل اسانس در روش SD ظرف ۵۰ دقیقه و ۹۶/۶۱ درصد از کل اسانس

بدست آمده در روش HD ظرف ۵۸ دقیقه پس از مشاهده اولین قطره اسانس، استخراج شده است. بنابر این علیرغم نیاز به گرم شدن برگ‌ها در روش SD، با اینحال استخراج در روش SD سریع‌تر از روش HD است.



شکل ۸. درصد بازدهی استخراج اسانس برگ پونه در فواصل زمانی مختلف در روش استخراج HD و SD

Figure 8: Percentage yield of essential oil from *Mentha longifolia* leaves at different time intervals in the HD and SD extraction methods

۳-۵- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

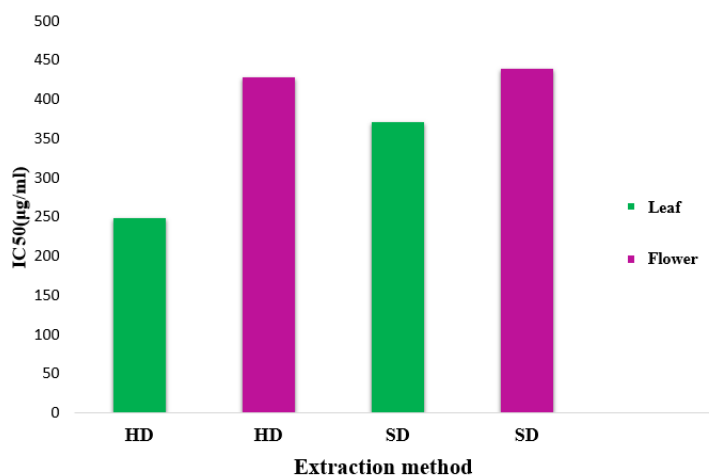
نتایج میانگین درصد مهار و انحراف معیار بدست آمده در غلظت‌های مختلف برای اسانس استخراج شده به روش HD و SD برای اسانس برگ و گل پونه در جدول ۶ گزارش شده است. همچنین مقدار IC_{50} برای اسانس برگ و گل پونه در روش HD به ترتیب برابر ۲۴۷/۷ و ۴۲۷/۸ و در روش SD به ترتیب برابر ۳۷۰/۲ و ۴۳۸/۹ و برای ویتامین ث ۵۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. همانطور که مشاهده می‌شود برای تمامی نمونه‌های اسانس با افزایش غلظت، درصد مهار رادیکال‌های آزاد افزایش یافت. معنی‌دار بودن اختلاف میانگین درصدهای مهار در هر غلظت با مقایسه دو نمونه اسانس گل بایکدیگر یا دو نمونه اسانس برگ پونه با یکدیگر با استفاده از آزمون T و حروف غیر مشابه در جدول ۶ نشان داده شده است

جدول ۶. نتایج میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف برای اسانس گل و برگ پونه استخراج شده با روش HD و SD و ویتامین ث

Table 6: Mean percentage results of DPPH free radical inhibition at different concentrations for the essential oils of *Mentha longifolia* flowers and leaves extracted using the HD and SD methods, as well as for vitamin C

Vitamin C	Mentha longifolia Leaf Essential Oil		Mentha longifolia Flower Essential Oil		Sample ($\mu\text{g/ml}$) Concentration
	SD	HD	SD	HD	
73.26 ± 3.08	8.10 ± 1.53^a	21.53 ± 1.66^b	9.19 ± 2.41^a	18.71 ± 1.91^b	62.5
80.61 ± 1.33	26.48 ± 2.09^a	40.27 ± 1.17^b	19.72 ± 1.85^a	20.89 ± 2.88^a	125
82.92 ± 0.82	41.02 ± 3.84^b	54.35 ± 0.71^b	32.41 ± 1.01^a	31.41 ± 1.53^a	250
86.87 ± 1.66	56.98 ± 1.78^a	63.64 ± 0.78^b	51.21 ± 2.16^a	52.80 ± 2.82^a	500
90.74 ± 0.62	74.02 ± 2.68^a	69.17 ± 0.34^b	76.11 ± 1.13^a	74.94 ± 0.66^a	1000
* Non same letters at each concentration for two essential oil samples HD and SD of flowers or leaves indicate significant difference. (p-value<0.05)					

با توجه به شکل ۹ مشاهده می‌شود با تغییر روش استخراج مقدار IC_{50} نمونه‌های اسانس گل و برگ تغییر کرد که این نتایج نشان می‌دهد روش‌های استخراج مختلف می‌تواند خاصیت آنتی‌اکسیدانی گل و برگ پونه را تحت تاثیر قرار دهد. در بین نمونه‌های مورد آزمایش برای گل و برگ پونه، اسانس روش HD فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به اسانس روش SD دارد ($HD > SD$)، ولی هر ۴ نمونه فعالیت ضعیف‌تری نسبت به ویتامین ث داشتند. پس با توجه به نتایج می‌توان دریافت که روش استخراج تقطیر با آب، روش مناسب تری جهت دستیابی به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر برای گل و برگ پونه می‌باشد و در روش‌های استخراج یکسان، برگ نسبت به گل توانایی بیشتری در مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را دارد.



شکل ۹. نمودار ستونی IC₅₀ برای اسانس‌های گل و برگ پونه استخراج شده با روش‌های مختلف

Figure 9: Bar chart of IC₅₀ for the essential oils of *Mentha longifolia* flowers and leaves extracted using different methods

۳-۶- فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای ۵ سویه باکتری

نتایج MIC و MBC برای ۴ نمونه اسانس برگ و گل پونه مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب در جدول ۷ و ۸ گزارش شده است.

جدول ۷. نتایج MIC و MBC برای اسانس‌های برگ پونه استخراج شده با روش‌های HD و SD

Table 7: Results of MIC and MBC for the essential oils of *Mentha longifolia* leaves extracted using the HD and SD met

MBC(µg/ml)		MIC(µg/ml)		Bacterial name
SD	HD	SD	HD	
1000>	1000>	1000	1000	aureus Staphylococcus
500	500	500	500	Acinetobacter
500	500	500	500	Escherichia coli(E.coli)
500	500	250	250	Enterococcus faecalis
1000>	1000>	1000>	1000>	Pseudomonas aeruginosa

باتوجه به آنچه در جدول ۷ گزارش شده مشاهده می‌شود که مقادیر MIC و MBC نمونه‌های اسانس برگ آزمایش شده در این پژوهش برای سویه باکتری یکسان، تفاوتی با هم نداشتند پس این اسانس‌ها بر روی هر سویه باکتری یکسان،

دارای اثر مهاری و کشندگی مشابه می‌باشد. همچنین سویه‌ی استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آسینتوباکتر، اشرشیاکلی و انتروکوکوس فکالیس در برابر اسانس‌های برگ پونه مقاومت بیشتری نشان دادند. همچنین کمترین غلظت بازدارندگی اسانس برگ پونه در بین باکتری‌های مورد مطالعه برای سویه‌ی انتروکوکوس فکالیس می‌باشد که یک باکتری گرم مثبت است.

جدول ۸. نتایج MIC و MBC برای اسانس‌های گل پونه استخراج شده با روش‌های HD و SD

Table 8: Results of MIC and MBC for the essential oils of *Mentha longifolia* flowers extracted using the HD and SD methods

MBC($\mu\text{g/ml}$)		MIC($\mu\text{g/ml}$)		Bacterial name
SD	HD	SD	HD	
1000>	1000>	1000	1000	aureus Staphylococcus
500	500	250	250	Acinetobacter
500	500	250	250	Escherichia coli(E.coli)
500	500	250	250	Enterococcus faecalis
1000>	1000>	1000>	1000>	Pseudomonas aeruginosa

برای اسانس‌های گل پونه با توجه به نتایج بدست آمده در جدول ۸ مشاهده می‌شود که فعالیت ضد میکروبی هر دو نمونه اسانس گل در برابر سویه سودوموناس آئروژینوزا یکسان است و برای سویه‌ی آسینتوباکتر، اشرشیاکلی، استافیلوکوک اورئوس و انتروکوکوس فکالیس مقدار MIC و MBC مشابه می‌باشد. بنابراین روش‌های استخراج HD و SD بر روی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گل و برگ پونه تاثیرگذار نبوده است. همچنین مقایسه‌ی مقدار MIC و MBC اسانس‌های گل و برگ نشان می‌دهد که گل پونه خاصیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به برگ در یک روش استخراج مشابه دارد.

۴- نتیجه گیری

بازده استخراج اسانس برای گل و برگ پونه در روش SD به ترتیب، 0.0909 ± 0.9915 و 0.346 ± 0.6361 و در روش HD به ترتیب برابر با 0.130 ± 0.35 و 0.186 ± 0.6503 بدست آمد. اختلاف بین میانگین درصد بازدهها در مقایسه برای دو نمونه اسانس گل با یکدیگر یا دو نمونه اسانس برگ با یکدیگر معنی دار نبود اما برای گل و برگ در یک روش استخراج معنی دار بود. همچنین با ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی مقدار IC50 برای اسانس برگ و گل پونه در روش HD به ترتیب برابر $247/7$ و $427/8$ و در روش SD به ترتیب برابر $370/2$ و $438/9$ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد که این نتایج نشان داد روش های استخراج مختلف می تواند خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس گل و برگ پونه را تحت تاثیر قرار دهد. همچنین در روش های استخراج یکسان، اسانس برگ نسبت به اسانس گل توانایی بیشتری در مهار ۵۰ درصد از رادیکال های آزاد DPPH را داشت ولی تمام نمونه ها نسبت به ویتامین ث ضعیف تر بودند. مقادیر MIC و MBC اسانس های گل، کمتر از اسانس های برگ شد ولی این مقادیر در مقایسه بین دو نمونه اسانس برگ پونه با یکدیگر یا دو نمونه اسانس گل پونه با یکدیگر که با دو روش HD و SD استخراج شده بودند، زمانی که سویه باکتری یکسان بود، تفاوتی با هم نداشتند. پس روش های استخراج HD و SD بر روی فعالیت ضد میکروبی اسانس های گل و برگ پونه تاثیرگذار نبود. همچنین ترکیب شیمیایی اسانس گل و برگ پونه پس از تجزیه و تحلیل با GC-MS بدست آمد. برای هر دو اسانس گل یا برگ پونه ۱۳ ترکیب شناسایی شد که به ترتیب $92/95$ و $92/88$ درصد از کل اسانس را تشکیل می داد. نوع و درصد ترکیبات شناسایی شده در دو نمونه اسانس تفاوت هایی داشتند و Pulegone، Piperitenone oxide، p-Menthofuran، Dihydrocarvone trans، Eucalyptol، Menthan-3-one و Piperitenone اصلی ترین ترکیبات مشترک بودند.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت های مالی شرکت شهرک های صنعتی استان کرمان، که در این پژوهش مساعدت و همراهی نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

References

- [1]. Gould K.(2016) "*Antibiotics: from prehistory to the present day*".Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **71**.572-575. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>
- [2]. Gaynes R.(2017) "*The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use*".Emerging infectious diseases. **23**.849-853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- [3]. Lewis K.(2013) "*Platforms for antibiotic discovery*".Nature reviews Drug discovery. **12**.371-387. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>
- [4]. Chait R. Vetsigian K. Kishony R. (2012) "*What counters antibiotic resistance in nature? Nature chemical biology*". **8**. 2-5. <https://doi.org/10.1038/nchembio.745>
- [5]. Blair J M.Webber M A.Baylay A J., et al.(2015) "*Molecular mechanisms of antibiotic resistance*".Nature reviews microbiology. **13**.42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- [6]. Yang S-K.Tan N-P.Chong C-W., et al.(2021) "*The missing piece: Recent approaches investigating the antimicrobial mode of action of essential oils*".Evolutionary Bioinformatics. **17**. 6881-6893. <https://doi.org/10.1177/1176934320938391>
- [7]. Muteeb G.Rehman M T.Shahwan M., et al.(2023) "*Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review*".Pharmaceuticals. **16**.1615-1669. <https://doi.org/10.3390/ph16111615>
- [8]. Sewanu S O.Bongekile M C.Folusho O O., et al.(2015)Rowland O A.(2015) "*Antimicrobial and efflux pumps inhibitory activities of Eucalyptus grandis essential oil against respiratory tract infectious bacteria*".Journal of Medicinal Plants Research. **9**.343-348. <https://doi.org/10.5897/JMPR2015.5652>
- [9]. Yap P S X.Lim S H E.Hu C P., et al.(2013) "*Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria*".Phytomedicine. **20**.710-713. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.013>
- [10]. Yang S-K.Yusoff K.Thomas W., et al.(2020) "*Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae*".Scientific reports. **10**.819. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55601-0>
- [11]. Singh R.Shushni M A.Belkheir A.(2015) "*Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L*".Arabian Journal of Chemistry. **8**.322-328. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.019>
- [12]. Öztürk H.Kolak U.Meric C.(2011) "*Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of Jurinea consanguinea DC*".Records of Natural Products. **5**.43-51. <https://doi.org/201808061454495>
- [13]. Roby M H H.Sarhan M A.Selim K A-H., et al.(2013) "*Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (Thymus vulgaris L.), sage (Salvia officinalis L.), and*

marjoram (Origanum majorana L.) extracts".Industrial Crops and Products. **43**.827-831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>

[14]. Abreu A C.McBain A J.Simões M.(2012) "*Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents*".Natural product reports. **29**.1007-1021. <https://doi.org/10.1039/C2NP20035J>

[15]. Affronti A.Orlando A.Cottone M.(2015) "*An update on medical management on Crohn's disease*".Expert opinion on pharmacotherapy. **16**.63-78. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.981525>

[16]. Murad H A.Abdallah H M.Ali S S.(2016) "*Mentha longifolia protects against acetic-acid induced colitis in rats*".Journal of ethnopharmacology. **190**.354-361. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.016>

[17]. Newman D J.Cragg G M.(2012) "*Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010*".Journal of natural products. **75**.311-335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>

[18]. Saharkhiz M J.Motamedi M.Zomorodian K., et al.(2012) "*Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of Mentha piperita L*".International Scholarly Research Notices .**1** .718645. <https://doi.org/10.5402/2012/718645>

[19]. Baser K H C.Buchbauer G.(2009) "*Handbook of essential oils: science, technology, and applications*". CRC press. <https://doi.org/10.1201/9781420063165>

[20]. Furtado F B.Borges B C.Teixeira T L., et al.(2018) "*Chemical composition and bioactivity of essential oil from Blepharocalyx salicifolius*".International journal of molecular sciences. **19**.33. <https://doi.org/10.3390/ijms19010033>

[21]. Bendaoud H.Romdhane M.Souchard J. P., et al.(2010) "*Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus molle L. and Schinus terebinthifolius Raddi berries essential oils*".Journal of food Science. **75**.C466-C472. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x>

[22]. Lai P.Rao H.Gao Y.(2018) "*Chemical composition, cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from Anthriscus caucalis M. Bieb grown in China*".Records of Natural Products. **12**.290-294. <http://doi.org/10.25135/rnp.31.17.07.046>

[23]. Mokaberinejad R.Zafarghandi N.Bioos S., et al.(2012) "*Mentha longifolia syrup in secondary amenorrhea: a double-blind, placebo-controlled, randomized trials*".DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. **20**.1-8. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-97>

[24]. Shah A J.Bhulani N N.Khan S H., et al.(2010) "*Calcium channel blocking activity of Mentha longifolia L. explains its medicinal use in diarrhoea and gut spasm*".Phytotherapy Research. **24**.1392-1397. <https://doi.org/10.1002/ptr.3263>

[25].Gulluce M.Sahin F.Sokmen M., et al.(2007) "*Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia*".Food chemistry. **103**.1449-1456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.061>

- [26]. Hajlaoui H, et al.(2009) "*Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (Mentha longifolia and Mentha pulegium) used in the Tunisian folkloric medicine*". World Journal of Microbiology and Biotechnology. **25**.2227-2238. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0130-3>
- [27]. Economou K.Oreopoulou V.Thomopoulos C.(1991) "*Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae*".Journal of the American Oil Chemists Society. **68**.109-113. <https://doi.org/10.1007/BF02662329>
- [28]. Kaur C.Kapoor H C.(2002) "*Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables*".International Journal of Food Science & Technology. **37**.153-161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00552.x>
- [29]. Okoh O.Afolayan A.(2011) "*The effects of hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods on the chemical composition and toxicity of essential oils from the leaves of Mentha longifolia L. subsp. capensis*".J Pharm Pharmacol. **5**.2474-2478. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.570>
- [30]. Bouin, A.S. and Wierer, M.(2014). "*Quality standards of the European Pharmacopoeia*". Journal of ethnopharmacology 158 (2014): 454-457.<https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.020>
- [31]. Blois, M. S. (1958)."*Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*".Nature, 181(4617), 1199-1200.<https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [32]. PA, W. (2002). "*Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard*". CLSI document M27-A2 .544-551. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1329730>
- [33]. Mkaddem M.Bouajila J.Ennajar M.Lebrihi A.Mathieu F.Romdhane M.(2009) "*Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of Mentha (longifolia L. and viridis) essential oils*".Journal of food science. **74**.M358-M363.<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01272.x>
- [34]. Jouneghani H A.Taghipour A. (2012) "*Essential oil content and composition of Mentha longifolia (L.) Hudson grown wild in Iran*".Journal of Medicinal Plants Research. **6**.4522-4525. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.933>
- [35]. Okut N.Yagmur M.Selcuk N.Yildirim B.(2017) "*Chemical composition of essential oil of Mentha longifolia L. subsp. longifolia growing wild*".**49**.53-67. <https://hdl.handle.net/20.500.12513/4164>
- [36]. Li S.Cheng F.Cao X.Mahinur B.Maiwulanjiang M.(2023) "*Evaluation of antimicrobial activity and mechanism of Mentha longifolia L. essential oil*".Journal of Food Safety. **43**.e13058. <https://doi.org/10.1111/jfs.13058>
- [37]. Bai X.Aimila A.Aidarhan N., et al.(2020) "*Chemical constituents and biological activities of essential oil from Mentha longifolia: Effects of different extraction methods*".International Journal of Food Properties. **23**.1951-1960. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1833035>

- [38]. Diop S M.Guèye M T.Ndiaye I., et al.(2016) "*Chemical composition of essential oils and floral waters of Mentha longifolia (L.) Huds. from Senegal*". American Journal of Essential Oils and Natural Products. **4**.46-49. <https://hdl.handle.net/2268/198548>
- [39]. Abdel-Hameed E-S S.Salman M S.Fadl M A.Elkhateeb A.Hassan M M.(2018) "*Chemical composition and biological activity of Mentha longifolia L. essential oil growing in Taif, KSA extracted by hydrodistillation, solvent free microwave and microwave hydrodistillation*". Journal of Essential Oil Bearing Plants. **21**.1-14. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1454343>
- [40]. Kokkini S.Karousou R.Lanaras T.(1995) "*Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece)*". Biochemical Systematics and Ecology. **23**.425-430. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(95\)00021-L](https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)00021-L)