بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و اثرات آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی عصاره گیاه *Nepeta pogonosperma*

فرحناز خلیقی سیگارودی[۱]، مریم اهوازی[۲]*، حمیرا ابراهیم‌زاده معبود[۳]، ناهید رحیمی‌فرد[٤]

۱- استادیار پژوهش، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۲- مربی پژوهش، گروه کشت و توسعه گیاهان دارویی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۳- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
٤- دانشیار، مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
صندوق‌پستی: ۱۳٦۹ - ۳۱۳۷۵
تلفن: ۳٤۷٦٤۰۱۰ (۰۲٦)، نمابر: ۳٤۷٦٤۰۲۱ (۰۲٦)
پست الکترونیک: maryame_ahvazi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۲۹ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۸/۱۹

چکیده

مقدمه: گیاه *Nepeta pogonosperma* از خانواده نعناع (Labiatae)، یکی از گونه‌های پونه‌سای انحصاری ایران (در منطقه الموت) می‌باشد. ترکیبات گزارش شده از جنس پونه‌سا شامل فلاونوئیدها، ایریدوئیدها، فنل‌ها و دی‌ترپن‌ها می‌باشند. گیاهان این جنس معطر بوده و اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، حشره‌کشی، ضدالتهابی، ضددردی و ضداضطرابی دارند، همچنین در طب سنتی به دلیل داشتن اثرات خلط‌آور، ضدعفونی‌کننده، ضدسرفه، ضدآسم و تب‌بر استفاده می‌شوند.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و اثرات آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی عصاره گیاه *Nepeta pogonosperma* در زمان گلدهی می‌باشد.

روش بررسی: محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه به روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به وسیله روش‌های روبش رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت آنتی‌اکسیدانی - احیاءکنندگی فریک (FRAP) مورد ارزیابی قرار گرفت. اسانس به روش تقطیر با آب به دست آمد و با کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: عصاره دارای محتوای تام فنلی بیشتری نسبت به محتوای تام فلاونوئیدی بود. عصاره متانولی اثر روبش رادیکال DPPH متوسطی (IC_{50} زیر ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از خود نشان داد. ۵۰ ترکیب که جمعاً ۹۵/۹۵ درصد ترکیبات اسانس را شامل می‌شدند، شناسایی شدند. ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس گیاه شامل ۸،۱ - سینئول و 4a*α*, 7*α*, 7a- نپتا لاکتون بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که عصاره گیاه *N. pogonosperma* دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بوده و می‌تواند به عنوان منبع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای درمان برخی بیماری‌ها درنظر گرفته شود. جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی فعال گیاه و ارزیابی‌های بیولوژیک جامع‌تر تحقیقات بیشتری ضروری می‌باشد.

گل‌واژگان: *Nepeta pogonosperma*، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ایران، ترکیبات اسانس، خانواده نعناع

مقدمه

جنس *Nepeta* L. (نپتا) با نام فارسی پونه‌سا یا قطرم در ایران علاوه بر گونه موردنظر در این مطالعه یعنی *Nepeta pogonosperma* Jamzad & Assadi، تعداد ٦٧ گونه گیاه علفی یک‌ساله و چند ساله دارد که اغلب آنها انحصاری ایران می‌باشند. دیگر گونه‌های آن علاوه بر ایران در تالش، آسیای جنوب‌غربی، عراق، آناتولی، ماورای قفقاز، افغانستان، آسیای مرکزی، ترکمنستان، سوریه و پاکستان نیز می‌رویند [١].

با مرور تحقیقاتی که تاکنون بر روی جنس پونه‌سا (نپتا) به عمل آمده است، ملاحظه می‌شود که این جنس بیشتر حاوی ترکیبات فلاونوئیدی (از زیر گروه فلاون‌ها) می‌باشد [٢]. از ترکیبات دیگر این جنس می‌توان به ایریدوئیدها، فنل‌ها و دی‌ترپن‌ها اشاره نمود [٥، ٤، ٣]. همچنین به دلیل داشتن اسانس در این جنس بسیاری از پژوهش‌ها بر روی شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس این گیاهان متمرکز شده است [١٨ – ٦]. در مرحله بعد تحقیقاتی بر روی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی این جنس گیاهی صورت پذیرفته است [٢٤ – ١٩]. پژوهش‌های پراکنده‌ای نیز بر روی اثرات حشره‌کشی، اثرات ضدالتهابی، ضددردی و ضداضطرابی این گیاهان انجام شده است [٢٩ – ٢٥].

برخی از گونه‌های جنس پونه‌سا (نپتا) به طور وسیعی در طب سنتی به دلیل داشتن اثرات خلط‌آور، ضدعفونی‌کننده، ضدسرفه، ضدآسم و تب‌بر استفاده می‌شوند. نوشیدنی‌ها و دم‌کرده تهیه شده از قسمت‌های هوایی گیاه *Nepeta crispa* Willd. در طب سنتی به عنوان آرام‌بخش، ملین، ضدنفخ، مقوی اعصاب و در اختلالات تنفسی استفاده می‌شوند. گیاه *N. cataria* L. به عنوان مقوی، ضدعفونی‌کننده و درمان سرماخوردگی مورد استفاده قرار می‌گیرد. عصاره برخی گونه‌های جنس پونه‌سا دارای اثرات مدری و باکتریواستاتیک می‌باشند و در پمادها برای بهبود اختلالات پوستی اگزما به کار می‌روند [٢٩].

از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها نظیر دیابت، پیری، التهاب، سرطان، آترواسکلروز، صدمات کبدی، آلزایمر، پارکینسون و بیماری‌های عروق کرونر قلب مؤثر می‌باشند [٣٠]، یافتن گیاهانی با اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی می‌تواند در کاهش سیر بیماری طیف وسیعی از بیماری‌ها بسیار مؤثر باشد. بنابراین در این مطالعه محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه و نیز اثرات آنتی‌اکسیدانی قسمت‌های هوایی گیاه در مرحله گل‌دهی به سه روش ١) بررسی فعالیت روبش رادیکال آزاد DPPH ٢) بررسی فعالیت روبش رادیکال ABTS ٣) بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی – احیاءکنندگی فریک (FRAP) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در بخش دیگر مطالعه اسانس گیاه به روش تقطیر با آب تهیه شده و ترکیبات شیمیایی و درصد آنها در اسانس گیاه با کمک دستگاه‌های کروماتوگرافی GC/MS و GC شناسایی و تعیین می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها

تمامی مواد شیمیایی استفاده شده، همچنین معرف‌ها و استانداردها از شرکت‌های Merck، Fluka، Sigma، Aldrich و Panreac خریداری شدند.

دستگاه‌ها

به منظور تهیهٔ عصاره خشک از دستگاه Rotatory evaporator، مدل EL 131 ساخت کشور سوئیس مجهز به حمام آب گرم، مدل BÜCHI 461 استفاده شد و برای اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی از دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش، مدل X-ma 2000 pc، ساخت شرکت Human Corporation استفاده شد.

جهت سونیکاسیون عصاره‌ها از دستگاه فراصوت مدل LC 130H، ساخت شرکت Elma استفاده شد همچنین به منظور همزدن محلول‌ها از دستگاه‌های Shaker، مدل OS 623 و Vortex مارک Eppendorf استفاده شد.

برای توزین مواد از ترازوی مدل AND HR-200 ساخت کشور ژاپن با دقت ٤ رقم اعشار (٠/٠٠٠١ گرم) استفاده شد. تنظیم pH توسط دستگاه pH متر ساخت شرکت Metrohm، مدل 825 انجام شد.

تهیه نمونه گیاه

گونه گیاهی *Nepeta pogonosperma* Jamzad & Assadi از ارتفاعات سیاهلان منطقه الموت قزوین ارتفاع ۳٤۰۰ متر از سطح دریا در زمان گل‌دهی در مردادماه ۱۳۹۰ جمع‌آوری شد و نمونه هرباریومی آن جهت شناسایی به هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی منتقل و پس از تأیید نام علمی، با کد (IMPH 527) در هرباریوم نگهداری شد. به منظور استخراج عصاره و اسانس، نمونه خشک شده گیاه شامل برگ‌ها، ساقه‌ها و گل‌ها به وسیله دستگاه آسیاب خرد شد.

عصاره‌گیری و تغلیظ

به منظور عصاره‌گیری از گیاه از روش اُزکان (Ozkan) و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد، به این صورت که مقدار ۲۰ گرم از پودر گیاه با ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول، به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری شد. پس از صاف شدن با قیف بوخنر و کاغذ صافی، توسط روتاری (دستگاه تقطیر در خلاء) در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره به دست آمده توزین شد و وزن عصاره تغلیظ شده و بازده عصاره‌گیری به دست آمد. عصاره تغلیظ شده تا زمان مصرف در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۳۱].

بررسی محتوای تام فنلی گیاه (Total Phenol)

جهت بررسی محتوای تام فنلی از روش کیم (Kim) و همکاران (۲۰۰۳) و خلیقی سیگارودی و همکاران (۲۰۱۲a) استفاده شد. به طور خلاصه غلظت‌های مختلف از گالیک اسید (استاندارد)، عصاره گیاه و آب مقطر (شاهد) در سه تکرار تهیه شد و به آنها به ترتیب، آب مقطر، معرف Folin-Ciocalteu و سدیم کربنات اضافه شد. بعد از ۹۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در برابر شاهد، توسط اسپکتروفتومتر UV، در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت محتوای تام فنلی گیاه برحسب مقدار معادل گالیک اسید (میلی‌گرم) در عصاره و پودر خشک گیاه (گرم) محاسبه شد [۳۳، ۳۲].

بررسی محتوای تام فلاونوئیدی گیاه (Total Flavonoid)

به منظور بررسی محتوای تام فنلی از روش خلیقی سیگارودی و همکاران (۲۰۱۲a) و یو (Yoo) و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. به طور خلاصه غلظت‌های مختلف از روتین (استاندارد)، عصاره و آب مقطر (شاهد) در سه تکرار تهیه شد و به آنها به ترتیب سدیم نیتریت، آلومینیوم کلرید و سود اضافه شد. سپس جذب محلول صورتی رنگ در برابر شاهد توسط اسپکتروفتومتر UV، در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت محتوای تام فلاونوئیدی گیاه برحسب مقدار معادل روتین (میلی‌گرم) در عصاره و پودر خشک گیاه (گرم) محاسبه شد [۳٤، ۳۳].

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه

بررسی فعالیت روبش رادیکال DPPH

جهت بررسی فعالیت روبش رادیکال DPPH از روش خلیقی سیگارودی و همکاران (۲۰۱۲b) استفاده شد. به این صورت که غلظت‌های مختلفی از آسکوربیک اسید (استاندارد) و عصاره گیاه در سه تکرار تهیه و به آنها محلول DPPH اضافه شد. برای تهیه محلول کنترل از متانول به جای عصاره استفاده شد. برای حذف رنگ عصاره‌ها از شاهد عصاره نیز استفاده شد. در انتها جذب محلول‌ها پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در محیط تاریک، توسط اسپکتروفتومتر UV، در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد ظرفیت روبش رادیکالی (RSA) به وسیله فرمول زیر محاسبه شد:

$$RSA\ (\%) = [1- (S - SB) / C] \times 100$$

در این فرمول S و SB به ترتیب میزان جذب نمونه (DPPH + عصاره) و جذب شاهد (متانول + عصاره) و C میزان جذب کنترل (DPPH + متانول) می‌باشد.

پس از به دست آوردن درصد ظرفیت روبش رادیکالی (RSA) مقدار IC_{50} عصاره و اسکوربیک اسید نیز تعیین شد. IC_{50} بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می‌شود و مقدار آن از طریق

رسم مقادیر مختلف RSA برحسب غلظت‌های مختلف نمونه و محاسبه معادله خط رگرسیون به دست می‌آید [۳۵].

بررسی فعالیت روبش رادیکال ABTS

به منظور فعالیت روبش رادیکال ABTS از روش هان (Han) و همکاران (۲۰۰۸) و ری (Re) و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. به طور خلاصه کاتیون رادیکال سبز - آبی $ABTS^{o+}$ از طریق مخلوط کردن ABTS با پتاسیم پرسولفات و نگهداری در مکان تاریک به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق ایجاد شد. محلول نهایی توسط متانول رقیق شد تا حدی که جذب آن به میزان ۰/۰۲ ± ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر برسد. سپس غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی در سه تکرار به محلول $ABTS^{o+}$ اضافه شد و بعد از ۶ دقیقه جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. از مخلوط ABTS و متانول به عنوان کنترل برای حذف اثر رنگ واکنشگر بر روی جذب و از متانول به عنوان شاهد برای صفر کردن جذب اسپکتروفتومتر استفاده شد. درصد RSA در این روش از رابطه زیر به دست آمد:

$$RSA\ (\%) = [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / (Abs_{control})] \times 100$$

در این رابطه $Abs_{control}$ جذب (ABTS + متانول) و Abs_{sample} جذب (ABTS + عصاره) می‌باشند. نتایج از طریق رسم منحنی کالیبراسیون آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد محاسبه شد و برحسب مقدار معادل آسکوربیک اسید (میلی‌گرم) در عصاره و پودر خشک گیاه (گرم) بیان شد.

پس از به دست آوردن درصد ظرفیت روبش رادیکالی (RSA) مقدار IC_{50} عصاره و اسکوربیک اسید نیز تعیین شد. IC_{50} بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می‌شود و مقدار آن از طریق رسم مقادیر مختلف RSA برحسب غلظت‌های مختلف نمونه و محاسبه معادله خط رگرسیون به دست می‌آید [۳۷، ۳۶].

بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی- احیاءکنندگی فریک FRAP

جهت بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی- احیاءکنندگی فریک FRAP از روش اِسترین و بِنزی (Benzie & Strain) (۱۹۹۶) و گالیتی (Galletti) و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. واکنشگر FRAP از طریق مخلوط کردن بافر استات با TPTZ در هیدروکلریک اسید و $FeCl_3.6H_2O$ تولید شد. سپس جذب محلول‌های حاوی واکنشگر و غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۱۵ دقیقه و در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. از واکنشگر FRAP به عنوان شاهد استفاده شد. همچنین از محلول آبی $FeSO_4.7H_2O$ با غلظت‌های مختلف برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. در نهایت مقدار FRAP برحسب میلی‌مول سولفات آهن بر گرم عصاره و پودر خشک گیاه بیان شد. از آسکوربیک اسید به عنوان ماده استاندارد در غلظت‌های مختلف استفاده شد [۳۹،۳۸].

اسانس‌گیری

برای تهیه اسانس گیاه از روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) و دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استفاده شد. اسانس به دست آمده در ویال کوچکی ریخته و به آن سولفات سدیم انیدر به منظور جذب آب اضافه شد. اسانس تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس

اسانس به دست آمده از مرحله قبل پس از آماده‌سازی، به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق شد، تا نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده آن مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگراف 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 HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم شد: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد، توقف در این دما ۵ دقیقه و دمای انتهایی ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. طیف‌سنج جرمی

مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت و نرم‌افزار مورد استفاده Wiley بود [۴۱،۴۰].

از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) جهت تعیین درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس استفاده شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده شده از نوع Younglin Acm6000 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. دمای ابتدایی آون 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 با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. دتکتور مورد استفاده FID بود.

آنالیز داده‌ها

برای هر یک از آزمون‌های مورد بررسی بسته به نوع آن، آزمایش در ۳ تا ٤ تکرار انجام شد. نتایج به دست آمده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بودند. داده‌ها با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel© و SPSS version 15.0© آنالیز شدند. مقادیر IC_{50} از طریق آنالیز رگرسیون خطی به دست آمد. برای مثال در تست بررسی فعالیت روبش رادیکال DPPH از روی معادله خط رگرسیون به دست آمده، غلظتی از عصاره یا آسکوربیک اسید که توانایی روبش ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH را دارا بودند، به دست آمد.

نتایج

بازده عصاره‌گیری و اسانس‌گیری

بازده عصاره‌گیری معادل ۵/۹۱ درصد وزنی - وزنی و بازده اسانس‌گیری معادل یک درصد حجمی - وزنی بود.

محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه

محتوای تام فنلی گیاه با استفاده از روش فولین- سیوکالت و با استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری شد. جهت تعیین محتوای تام فلاونوئیدی گیاه از روش تشکیل کمپلکس $AlCl_3$ و استاندارد روتین استفاده شد. نتایج حاصل از انجام این تست‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

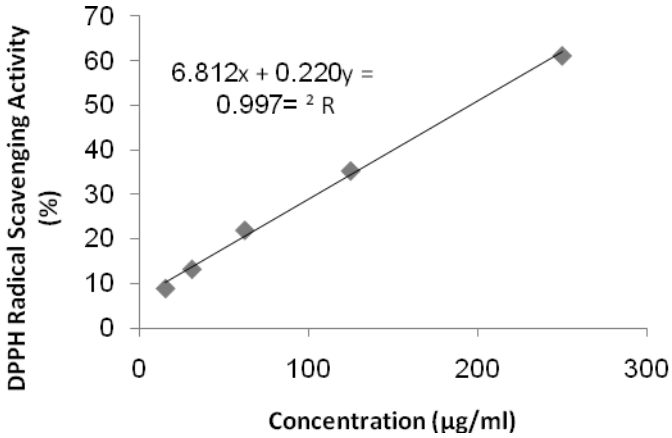
اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به وسیله روش‌های روبش رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت آنتی‌اکسیدانی- احیاءکنندگی فریک (FRAP) مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش روبش رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS منحنی درصد روبش رادیکال در برابر غلظت رسم شد. سپس از روی معادله خط رگرسیون به دست آمده، غلظتی از عصاره یا آسکوربیک اسید (استاندارد) که توانایی روبش ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را دارا بودند (IC_{50})، به دست آمد (نمودار شماره‌های ۱ و ۲ و جدول شماره ۱). مقادیر به دست آمده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشند. باید توجه داشت در این شرایط هر چه مقدار IC_{50} کوچک‌تر باشد، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر خواهد بود. در تست روبش رادیکال ABTS مقدار جذب خوانده شده برای عصاره در نمودار مربوط به آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد نیز قرار داده شد و برحسب میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم عصاره و پودر خشک گیاه بیان شد (جدول شماره ۱).

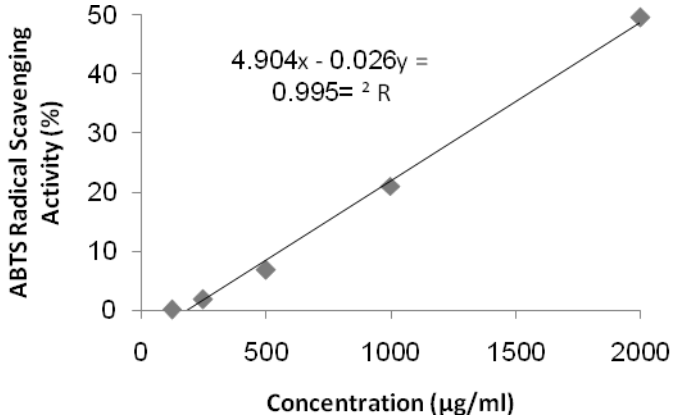
جدول شماره ۱- نتایج بررسی محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی و اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاه *Nepeta pogonosperma*

ردیف	واحد	گیاه *Nepeta pogonosperma*	استاندارد آسکوربیک اسید
محتوای تام فنلی	(میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره)	۵۹۵/۶۸ ± ۷۳/۲۸	-
محتوای تام فنلی	(میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم پودر خشک)	۳۵/۲۰ ± ٤/۳۳	
محتوای تام فلاونوئیدی	(میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره)	۲٤۹/۰۱ ± ۹/۲۵	-
محتوای تام فلاونوئیدی	(میلی‌گرم روتین بر گرم پودر خشک)	۱٤/۷۲ ± ۰/۵۵	
IC_{50} روبش رادیکال DPPH	(میکروگرم در میلی‌لیتر)	۱۹۵/۸۷ ± ۰/۰۳	۸/۲۲ ± ۰/۰۰۱
IC_{50} روبش رادیکال ABTS	(میکروگرم در میلی‌لیتر)	۲۰٤٤/۱۲ ± ۰/۱۵	۱۲۰/۱۲ ± ۰/۰۱
تست روبش رادیکال ABTS	(میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم عصاره)	۷٦/۳۸ ± ٤/٦۰	-
تست روبش رادیکال ABTS	(میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر خشک)	٤/۵۱ ± ۰/۲۷	
تست FRAP	(میلی‌مول سولفات آهن بر گرم عصاره)	۱/۰٦ ± ۰/۰۳	۱٤/۳۷ ± ۰/٤۲
تست FRAP	(میلی‌مول سولفات آهن بر گرم پودر خشک)	۰/۰٦ ± ۰/۰۰۲	

* نتایج به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده‌اند.



نمودار شماره ۱- نمودار درصد فعالیت روبش رادیکال DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره



نمودار شماره ۲- نمودار درصد فعالیت روبش رادیکال ABTS توسط غلظت‌های مختلف عصاره

در تست FRAP فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت میلی‌مول Fe^{2+} در گرم عصاره و پودر خشک گیاه گزارش شد. لذا محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوتی از سولفات آهن ساخته و منحنی جذب در برابر غلظت رسم شد. با جای‌گذاری مقادیر جذب عصاره در معادله خط رگرسیون آهن مقدار معادل میلی‌مول آهن در هر گرم عصاره و پودر خشک گیاه به دست آمد. در این تست از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد (نمودار شماره ۳ و جدول شماره ۱).

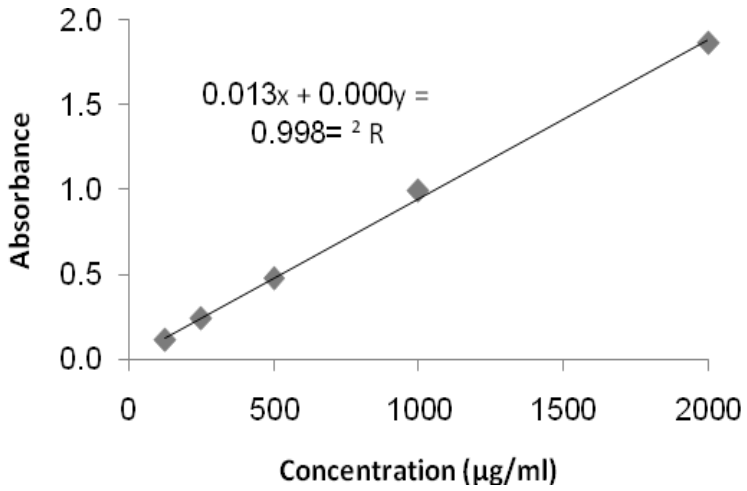
بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس

نتایج بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *Nepeta pogonosperma* شامل نوع و درصد ترکیبات شناسایی شده در اسانس که از بررسی طیف‌های حاصل از تزریق اسانس به دستگاه GC/MS و GC به دست آمده است، در جدول شماره ۲ خلاصه شده است.

بحث

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیشتر در گیاهانی موجود می‌باشند که حاوی ترکیبات فنلی هستند. محتوای فنلی و ترکیبات گیاه به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی وابسته می‌باشند. ترکیبات آنتی‌اکسیدان فراوانی در گیاهان موجود می‌باشند و شناسایی تک‌تک آنها کاری دشوار می‌باشد. بنابراین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با سنجش‌های متعدد ارزیابی می‌شود [۲۲]. در این تحقیق علاوه بر اندازه‌گیری محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه به روش رنگ‌سنجی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به وسیله روش‌های روبش رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت آنتی‌اکسیدانی - احیاءکنندگی فریک (FRAP) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تست ABTS یکی از رایج‌ترین روش‌های سنجش غیرمستقیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این روش براساس ردیابی کاهش تولید کاتیون - رادیکال $ABTS^{o+}$ به‌وسیله اکسیداسیون ABTS در حضور یک نمونه حاوی ترکیبات فنلی می‌باشد. از محاسن تست ABTS سادگی نسبی آن در تعیین مقدارهای رایج آزمایشگاهی می‌باشد. از معایب تست ABTS وابستگی آن به زمان را می‌توان نام برد زیرا واکنش اکسیداتیو برخی ترکیبات ممکن است با تأخیر صورت پذیرد و در تست مشخص نشود. لذا زمان انکوباسیون در نتایج به دست آمده مؤثر می‌باشد [۴۲].



نمودار شماره ۳- نمودار میزان جذب کمپلکس $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ در تست FRAP توسط غلظت‌های مختلف عصاره

جدول شماره ۲- نوع و درصد ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه *Nepeta pogonosperma*

ردیف	نام ماده	اندیس بازداری	درصد	ردیف	نام ماده	اندیس بازداری	درصد
۱	Ethyl isovalerate	۸۲۵	۰/۱۶	۲۶	*δ*-Terpineol	۱۱۵۷	۳/۰۶
۲	3Z-Hexenol	۸۲۹	۰/۱۲	۲۷	Terpinen-4-ol	۱۱۶۶	۷/۰۳
۳	2-Methyl butyl acetate	۸۵٤	۰/۲۷	۲۸	*p*-Methyl acetophenone	۱۱۶۸	۰/۰۸
٤	*α*-Thujene	۹۱۰	۰/٤۵	۲۹	Cryptone	۱۱۷۰	۰/۰۷
۵	*α*-Pinene	۹۱۶	۲/۰۹	۳۰	*α*-Terpineol	۱۱۸۱	٦/۷٦
٦	Camphene	۹۲۹	۰/۰۸	۳۱	Myrtenol	۱۱۸۳	۰/۳٤
۷	*β*-Pinene	۹٦۱	۷/۰٦	۳۲	*cis*-Piperitol	۱۱۹٤	۰/۱۷
۸	Dehydro-1,8-cineole	۹۷۳	۰/۲٦	۳۳	Methyl *α*-cyclogeranate	۱۲۰۰	۱/۵۸
۹	Myrcene	۹۷٦	۰/٦۵	۳٤	*trans*-Dihydro carvone	۱۲۰۳	۰/۰۸
۱۰	*p*-Cymene	۱۰۰۹	۰/۹۹	۳۵	Benzyl propanate	۱۲۵۷	۰/۳٤
۱۱	1,8-Cineole	۱۰۱۹	۳۳/۲۱	۳٦	*trans*-Ascaridol glycol	۱۲٦۸	۰/۱۸
۱۲	(Z)-*β*-Ocimene	۱۰۲٦	۰/۲۵	۳۷	4a*α*,7*α*,7a*α*-Nepetalactone	۱۳۵۰	۱۲/۰٦
۱۳	Benzene acetaldehyde	۱۰۲۸	۰/۱٤	۳۸	Geranyl acetate	۱۳٦۸	۲/٤۸
۱٤	(E)-*β*-Ocimene	۱۰۳٤	۰/۱۲	۳۹	4a*α*,7*β*,7a*α*-Nepetalactone	۱۳۸۰	٤/۲۳
۱۵	*γ*-Terpinene	۱۰٤٤	۰/۱۰	٤۰	Methyl eugenol	۱۳۸۵	۰/۲۰
۱٦	*cis*-Sabinene hydrate	۱۰۵۳	۱/٤۷	٤۱	(E)-Caryophyllene	۱٤۰۰	۰/۲۲
۱۷	*trans*-Linalool oxide	۱۰۵۷	۰/۲۵	٤۲	Carvone hydrate	۱٤۰٦	۰/۰۸
۱۸	*cis*-Linalool oxide	۱۰۷۲	۰/۲۳	٤۳	*α*-Humulene	۱٤۳٤	۰/۰۵
۱۹	Linalool	۱۰۹۰	۵/۹۲	٤٤	(E)-*β*-Farnesene	۱٤۳۷	۰/۱۷
۲۰	endo-Fenchol	۱۰۹۷	۰/۰۸	٤۵	Phenyl ethyl 2-methyl butanoate	۱٤٦٦	۰/۰۷
۲۱	*cis-p*-Menth-2-en-1-ol	۱۱۰٦	۰/٤۷	٤٦	Phenyl ethyl 3-methyl butanoate	۱٤۷۰	۰/۰٦
۲۲	Nopinone	۱۱۱۸	۰/۰۹	٤۷	(Z)-*α*-Bisabolene	۱٤۸٤	۰/۸٤
۲۳	*trans*-Pinocarveol	۱۱۲۲	۰/۳۲	٤۸	Modhephen-8-*β*-ol	۱٤۸۸	۰/۱٤
۲٤	*trans*-p-Menth-2-en-1-ol	۱۱۲٤	۰/۲۷	٤۹	Caryophyllene oxide	۱۵٦۲	۰/٦۱
۲۵	Pinocarvone	۱۱٤٤	۰/۱۱	۵۰	Humulene epoxide II	۱۵۸۸	۰/۰۷
	همی‌ترپن‌های اکسیژنه		۰/٤۳		فنیل پروپانوئیدها		۰/۲۰
	مونوترپن‌های هیدروکربنه		۱۱/۷۹		سزکویی‌ترپن‌های هیدروکربنه		۱/۳٦
	مونوترپن‌های اکسیژنه		۸۰/۳۸		سزکویی‌ترپن‌های اکسیژنه		۰/۸۲
	ترکیبات دیگر		۰/۹۷		ترکیبات شناسایی نشده		٤/۰۵
	کل ترکیبات شناسایی شده						**۹۵/۹۵**

تست DPPH یکی از قدیمی‌ترین روش‌های سنجش غیرمستقیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که برای یافتن ترکیبات دهنده هیدروژن در مواد طبیعی پیشنهاد شده است. تست DPPH بر اساس واکنش رادیکال آزاد پایدار DPPH با ترکیبات‌دهنده هیدروژن مانند فنل‌ها استوار می‌باشد. این تست نسبت به ABTS اختصاصی‌تر عمل می‌کند و بخصوص با

ترکیباتی که حاوی گروه هیدروکسیل می‌باشند، واکنش می‌دهد. برعکس ABTS، رادیکال DPPH با فلاونوییدهایی که گروه هیدروکسیل در حلقه B خود ندارند و اسیدهای آروماتیک که حاوی تنها یک گروه هیدروکسیل می‌باشند، واکنش نمی‌دهد [٤٢].

تست FRAP بر پایه توانایی ترکیبات فنلی در احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} استوار می‌باشد [٤٢]. ترکیبات آنتی‌اکسیدان ردیابی شده به وسیله FRAP محدود به ترکیبات محلول در آب (همچنین ترکیبات محلول در حلال‌های هیدروالکلی) می‌باشند و برای مثال کاروتنوئیدها را که قابلیت احیای یون فریک را ندارند، دربرنمی‌گیرد. همچنین جذب برخی ترکیبات مانند کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوئرستین و تانیک اسید در زمان‌های کوتاه اندازه‌گیری تثبیت نمی‌شود و به آهستگی با گذشت چند ساعت از زمان واکنش افزایش می‌یابد [٤٣]. به دلیل تنوعی که در ترکیبات گیاهان مختلف وجود دارد، معمولاً از چند روش برای بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی بهره می‌برند، تا معایب روش‌های مختلف پوشانده شود.

در پژوهش حاضر، محتوای تام فنلی موجود در گیاه *Nepeta pogonosperma* معادل ٥٩٥/٦٨ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره خشک بود. همچنین معادل ٣٥/٢٠ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم پودر گیاه خشک محاسبه شد. در یک مطالعه محتوای تام فنلی عصاره‌های مختلف (هگزانی، دی‌کلرومتانی و فراکسیون‌های متانولی) گیاه *Nepeta flavida* بررسی شد. بالاترین میزان تام فنل در فراکسیون قطبی عصاره متانولی معادل ٢٠٠ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره خشک و فراکسیون غیرقطبی عصاره متانولی ١٨٨ میلی‌گرم در گرم بود و کمترین میزان در عصاره هگزانی معادل ١١/٩ میلی‌گرم در گرم عصاره بود. به خصوص همبستگی مثبتی بین محتوای تام فنلی و اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها مشاهده شد. در نتیجه پتانسیل اثر آنتی‌اکسیدانی فراکسیون‌های قطبی و غیرقطبی عصاره متانولی می‌تواند ناشی از محتوای فنلی بالای آنها باشد [٢٤]. در مقایسه با تحقیق ما بالاترین محتوای تام فنلی این گیاه تقریباً برابر یک سوم گیاه *Nepeta pogonosperma* می‌باشد. در مطالعه‌ای بر روی پونه‌سای گربه‌ای یا نعناع گربه‌ای مشاهده شد که محتوای تام ترکیبات فنلی آن معادل ٢/٢٦ درصد گالیک اسید در عصاره می‌باشد [١٩] که به مراتب از گیاه ما پایین‌تر می‌باشد. در تحقیقی بر روی *N. italica*، *N. cilicia* و *N. caesarea* مشخص شد که میزان محتوای تام فنلی آنها به ترتیب برابر با ٢٤/٨، ٢١/٤ و ١٧/٣ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره بود که به مراتب از گیاه ما پایین‌تر می‌باشد [٢٢]. در مطالعه‌ای دیگر بر روی *N. melissifolia* مشخص شد که میزان محتوای تام فنلی آن برابر با ٣١/٦ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم نمونه خشک بود که از گیاه ما (٣٥/٢٠ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم پودر گیاه خشک) پایین‌تر می‌باشد [٤٤]. در یک بررسی که اخیراً به چاپ رسیده است محتوای تام فنلی دو گیاه *N. crassifolia* و *N. binaludensis* به ترتیب برابر با ٩١٢/٧ و ٤٠١/٢ میلی‌گرم کلروژنیک اسید در هر صد گرم گیاه بودند که با تبدیل واحدها به مراتب از گیاه ما پایین‌تر می‌باشند [٤٥].

محتوای تام فلاونوییدی موجود در گیاه *Nepeta pogonosperma* معادل ٢٤٩/٠١ میلی‌گرم روتین در هر گرم عصاره و معادل ١٤/٧٢ میلی‌گرم روتین در هر گرم پودر خشک گیاه تعیین شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود محتوای تام فنلی گیاه تقریباً دو برابر محتوای تام فلاونوییدی گیاه می‌باشد. بررسی‌های اندکی بر روی سایر گونه‌های جنس نپتا در زمینه محتوای تام فلاونوییدی صورت پذیرفته است. در یک بررسی بر روی *N. crassifolia* و *N. binaludensis* مشخص شد که میزان محتوای تام فلاونوییدی آنها به ترتیب برابر با ١٠٩/٣ و ٣٨/٧ میلی‌گرم کوئرستین در هر صد گرم گیاه می‌باشد که با تبدیل واحدها مشخص می‌شود به مراتب از گیاه ما پایین‌تر می‌باشند [٤٥].

در بخش بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی از ٣ روش برای ارزیابی این فعالیت در گیاه موردنظر استفاده شد. در روش اول فعالیت روبش رادیکال DPPH مورد بررسی قرار گرفت. غلظتی از عصاره گیاه یا آسکوربیک اسید به عنوان ماده استاندارد که توانایی روبش ٥٠ درصد از رادیکال آزاد DPPH را دارا بودند (IC_{50}) به دست آمد. باید توجه داشت در این شرایط هر چه مقدار IC_{50} کوچک‌تر باشد، خاصیت

آنتی‌اکسیدانی بیشتر خواهد بود. مقادیر IC_{50} به دست آمده برای عصاره گیاه *Nepeta pogonosperma* برابر با ۱۹۵/۸۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای آسکوربیک اسید ۸/۲۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در یک مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های مختلف (هگزانی، دی‌کلرومتانی و فراکسیون‌های متانولی) گیاه *Nepeta flavida* بررسی شد. ارزش IC_{50} اسانس برابر با ٤٢/٨ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در بین عصاره‌ها، قوی‌ترین اثر مربوط به فراکسیون قطبی عصاره متانولی با ارزش IC_{50} اسانس برابر با ٦٣/٢ میکروگرم در میلی‌لیتر بود [٢٤]، که در مقایسه با گیاه مورد مطالعه ما اثر آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری داشتند. در مطالعه‌ای بر روی پونه‌سای گربه‌ای یا نعناع گربه‌ای مشاهده شد که ارزش IC_{50} عصاره متانولی گیاه برابر ۱۷۱/۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود [۱۹] که اندکی از گیاه ما قوی‌تر می‌باشد. در تحقیقی بر روی *N. italica*، *N. cilicia* و *N. caesarea* مشخص شد که IC_{50} عصاره متانولی گیاه به ترتیب برابر با ۲۵/۵، ۳۳/٤ و ۳۹/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در مقایسه با گیاه مورد مطالعه ما اثر آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری داشتند [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر نیز بر روی *N. melissifolia* مقدار IC_{50} عصاره متانولی گیاه برابر با ۵/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در مقایسه با گیاه مورد مطالعه ما اثر آنتی‌اکسیدانی به مراتب قوی‌تری داشت [٤٤].

در روش دوم بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، فعالیت روبش رادیکال ABTS بررسی شد. نتایج حاصل از این تست به دو صورت بیان شد. ابتدا مقدار معادل آسکوربیک اسید بر گرم عصاره و پودر خشک گیاه محاسبه شد. به این ترتیب گیاه اثری معادل ٧٦/٣٨ میلی‌گرم آسکوربیک اسید در هر گرم عصاره و معادل ٤/٥١ میلی‌گرم آسکوربیک اسید در هر گرم پودر خشک گیاه از خود نشان داد. از سوی دیگر مقدار IC_{50} به دست آمده برای تست ABTS در مورد گیاه معادل ٢٠٤٤/١٢ میکروگرم در میلی‌لیتر و در مورد آسکوربیک اسید معادل ١٢٠/١٢ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در یک بررسی بر روی *N. crassifolia* و *N. binaludensis* مشخص شد که مقدار IC_{50} به دست آمده برای تست ABTS در مورد عصاره متانولی این گیاهان به ترتیب معادل ١٣/٤ و ٥٨/١ میکروگرم در میلی‌لیتر و در مورد آسکوربیک اسید معادل ١/٠ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که به مراتب از گیاه ما قوی‌تر می‌باشند [٤٥].

در روش سوم قدرت آنتی‌اکسیدانی – احیاءکنندگی فریک (FRAP) به صورت میلی‌مول Fe^{2+} در گرم عصاره و پودر خشک گیاه گزارش شد. لذا محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوتی از سولفات آهن ساخته و منحنی جذب در برابر غلظت رسم شد. با جای‌گذاری مقادیر جذب عصاره در معادله خط رگرسیون آهن مقدار معادل میلی‌مول آهن در هر گرم عصاره و پودر خشک گیاه به دست آمد. در این تست از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. به این ترتیب گیاه معادل ١/٠٦ میلی‌مول آهن در هر گرم عصاره و معادل ٠/٠٦ میلی‌مول آهن در هر گرم پودر خشک گیاه در تست FRAP از خود فعالیت نشان داد. در برابر استاندارد آسکوربیک اسید که معادل ١٤/٣٧ میلی‌مول آهن در هر گرم آن فعالیت داشت.

بازده اسانس‌گیری از گیاه به روش تقطیر با آب، برابر یک درصد حجمی – وزنی بود. در بخش بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس، ٥٠ ترکیب شناسایی شدند که جمعاً ٩٥/٩٥ درصد ترکیبات اسانس را شامل می‌شدند. ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس گیاه شامل ٨،١- سینئول (٣٣/٢١ درصد)، 7aα, 7α, 4aα- نپتا لاکتون (١٢/٠٦ درصد)، بتا- پینن (٧/٠٦ درصد)، ترپینن-٤- اُل (٧/٠٣ درصد)، آلفا- ترپینئول (٦/٧٦ درصد)، لینالول (٥/٩٢ درصد)، 7aα, 7β, 4aα- نپتا لاکتون (٤/٢٣ درصد)، دلتا – ترپینئول (٣/٠٦ درصد)، ژرانیل استات (٢/٤٨ درصد) و آلفا – پینن (٢/٠٩ درصد) بودند. در این میان بیشترین ترکیبات مربوط به مونوترپن‌های اکسیژنه (٨٠/٣٨ درصد) و مونوترپن‌های هیدروکربنه (١١/٧٩ درصد) بودند.

در تحقیق حاضر گیاه از ارتفاعات سیاهلان منطقه الموت قزوین ارتفاع ٣٤٠٠ متر از سطح دریا در زمان گل‌دهی در مردادماه جمع‌آوری شد و بازده اسانس به دست آمده یک درصد حجمی- وزنی و حاوی ترکیبات اصلی فوق‌الذکر بود. در حالی که در تحقیقی دیگر این گیاه از خشچال الموت (ارتفاع ٣٠٠٠ متری از سطح دریا) در تیرماه جمع‌آوری شد و

آنالیز اسانس بر روی آن انجام پذیرفت. بازده اسانس سرشاخه‌های گل‌دار گیاه ۱/۷ درصد محاسبه شد و عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس شامل 4aα, 7α, 7aβ- نپتا لاکتون (۵۷/٦ درصد)، ۸،۱- سینئول (۲٦/٤ درصد)، بتا- پینن (۳/۷ درصد)، لینالول (۲/۱ درصد)، آلفا - ترپینئول (۲/۱ درصد)، بود [۱٦]. همان‌طور که ملاحظه می‌شود اختلاف در ارتفاع جمع‌آوری گیاه باعث ایجاد اختلاف در نوع و درصد ترکیبات اصلی شناسایی شده در گیاه شده است.

در تحقیقی دیگر این گیاه از حومه قزوین در اردیبهشت‌ماه جمع‌آوری شد (محل دقیق و ارتفاع در مقاله ذکر نشده است) و اسانس قسمت‌های هوایی گل‌دار آن مورد ارزیابی قرار گرفت. عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس شامل ۸،۱- سینئول (۳۱/۲ درصد)، 4aα, 7α, 7aα- نپتا لاکتون (۱٤/۵ درصد)، آلفا - ترپینئول (۵/٤ درصد)، (E)- آلفا- بیزابولن (۵/٤ درصد)، ترپینن-٤- اُل (٤/۸ درصد)، لینالول (٤/۵ درصد) و بتا- پینن (۳/۵ درصد) بود [۲۹]. تحقیق اخیر از نظر نوع و درصد ترکیبات اصلی شناسایی شده در گیاه به تحقیق ما شباهت بیشتری دارد و به نظر می‌رسد که از نظر منطقه و ارتفاع نزدیک به هم می‌باشند. تفاوت دو تحقیق در تعداد ترکیبات شناسایی شده در اسانس می‌باشد، به طوری که در این تحقیق ۳۵ ترکیب شناسایی شده است و در تحقیق ما ۵۰ ترکیب مورد شناسایی قرار گرفته است.

در جدول شماره‌های ۳ و ٤ ترکیبات اصلی اسانس چند گونه نپتا برای مقایسه با گیاه *Nepeta pogonosperma* آورده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود گونه‌های مختلف جنس نپتا را از نظر ترکیبات شیمیایی اصلی اسانس می‌توان به دو دسته عمده تقسیم نمود. دسته اول حاوی مونوترپن‌های اکسیژنه (۸،۱- سینئول، 4aα, 7α, 7aα- نپتا لاکتون و 4aα, 7α, 7aβ- نپتا لاکتون) به عنوان ترکیبات اصلی می‌باشند، که گیاه *Nepeta pogonosperma* متعلق به این دسته می‌باشد (جدول شماره ۳). در حالی که دسته دوم حاوی سزکویی‌ترپن‌های هیدروکربنه و اکسیژنه (E- کاریوفیلن، جرماکرن- د، اسپاتولنول، کاریوفیلن اکسید، ویریدیفلورول و τ- کادینول) به عنوان اصلی‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس می‌باشند (جدول شماره ٤).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گیاه *Nepeta pogonosperma* دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که در بین گونه‌های مختلف جنس پونه‌سا اثر متوسطی محسوب می‌شود. از سوی دیگر با بررسی محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه مشخص شد که گیاه حاوی ترکیبات فنلی بیشتری به نسبت ترکیبات فلاونوییدی می‌باشد. در مقایسه با سایر گونه‌های جنس پونه‌سا نیز مقدار ترکیبات فنلی آن به مراتب بالاتر می‌باشد.

جدول شماره ۳- نوع و درصد ترکیبات اصلی اسانس گونه‌های نپتای حاوی مونوترپن‌های اکسیژنه

نام ماده	اندیس بازداری رفرانس	*N. crassifolia* [7]	*N. crispa* [23]	*N. menthoides* [18]	*N. meyeri* [17]	*N. parnassica flowering* [8]	*N. parnassica vegetative* [8]	*N. pogonosperma*	*N. pogonosperma* [16]	*N. pogoncsperma* [29]
1,8-Cineole	۱۰۳۱		٤۷/۹	۳۱/۳	۲۹/۳	۳٤/٦	۲۱/۱	۳۳/۲	۲٦/٤	۳۱/۲
4aα,7α,7aα-Nepetalactone	۱۳٦۰	۹۲/٦		۳٦/۹		۱۷/۳		۱۲/۱		۱٤/۵
4aα,7α,7aβ-Nepetalactone	۱۳۸۷		۲۰/۳		۵۳/۲		۲۲/۰		۵۷/٦	

جدول شماره ٤- نوع و درصد ترکیبات اصلی اسانس گونه‌های نپتا حاوی سزکویی‌ترپن‌های هیدروکربنه و اکسیژنه

نام ماده	اندیس بازداری رفرانس	*N. depauperata* [13]	*N. fissa* [15]	*N. macrosiphon* [46]	*N. makuensis* [9]
(E)-Caryophyllene	١٤١٩	١٢/٩	١٧/٤		
Germacrene D	١٤٨٥			٩/٢	
Spathulenol	١٥٧٨	٣١/٨		١٤/١	
Caryophyllene oxide	١٥٨٣		١٢/٣		
Viridiflorol	١٥٩٣				١٧/٥
τ-Cadinol	١٦٤٠				١٠/٧

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهش و فناوری جهاددانشگاهی که حمایت مالی این طرح پژوهشی با عنوان «**بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *Nepeta pogonosperma* Jamzad & Assadi و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره گیاه**» (کد: ٣٣ – ١٨٣٩) را تقبل نمودند، قدردانی می‌شود.

منابع

1. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names: Latin - English - Persian. 4th Ed. Farhang Moaser. Tehran. 2006, P: 360.

2. Jamzad Z, Grayer RJ, Kite GC, Simmonds MSJ, Ingrouille M and Jalili A. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. *Biochem. Syst. Ecol.* 2003; 31: 587 - 600.

3. Takeda Y, Matsumoto T, Ooiso Y, Honda G, Tabata M, Fujita T, Otsuka H, Sezik E and Yesilada E. Nepetacilicioside, a new iridoid glucoside from *Nepeta cilicia*. *J. Nat. Prod.* 1996; 59 (5): 518 - 9.

4. Takeda Y, Ooiso Y, Masuda T, Honda G, Otsuka H, Sezik E and Yesilada E. Iridoid and eugenol glycosides from *Nepeta cadmea*. *Phytochemistry* 1998; 49 (3): 787 - 91.

5. Fraga BM, Hernandez MG, Mestres T and Arteaga JM. Abietane diterpenes from *Nepeta teydea*. *Phytochemistry* 1998; 47 (2): 251 - 4.

6. Dabiri M and Sefidkon F. Chemical composition of the essential oil of *Nepeta racemosa* Lam. from Iran. *Flavour Frag. J.* 2003; 18: 157 - 8.

7. Dabiri M and Sefidkon F. Chemical composition of *Nepeta crassifolia* Boiss. & Buhse oil from Iran. *Flavour Frag. J.* 2003; 18: 225 - 7.

8. Gkinis G, Tzakou O, Iliopoulou D and Roussis V. Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones. *Z. Naturforsch. C* 2003; 58: 681 - 6.

9. Habibi Z, Masoudi Sh and Rustaiyan A. Essential oil of *Nepeta makuensis* Jamzad et Mozaffarian from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 2004; 16

(3): 214 - 5.

10. Javidnia K, Miri R, Safavi F, Azarpira A and Shafiee A. Composition of the essential oil of *Nepeta persica* Boiss from Iran. *Flavour Frag. J.* 2002; 17 (1): 20-22.

11. Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mentis A, Mitaku S and Charvala C. Composition of the essential oil of two *Nepeta* species and in vitro evaluation of their activity against Helicobacter pylori. *Planta Med.* 2001; 67 (9): 880 - 3.

12. Kaya A, Demirci B and Baser KHC. Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. congesta (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *S. Afr. J. Bot.* 2007; 73: 29 - 34.

13. Mehrabani M, Asadipour A and Saber Amoli S. Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta depauperata* Benth. from Iran. *Daru* 2004; 12 (3): 98 - 100.

14. Sajjadi SE. Analysis of the essential oil of *Nepeta sintenisii* Bornm. from Iran. *Daru* 2005; 13 (2): 61 - 4.

15. Sefidkon F, Dabiri M and Alamshahi A. Analysis of the essential oil of *Nepeta fissa* C.A. Mey from Iran. *Flavour Frag. J.* 2002; 17: 89 - 90.

16. Sefidkon F and Akbari-nia A. Essential oil composition of *Nepeta pogonosperma* jamzad et assadi from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 2003; 15 (5): 327 - 8.

17. Sefidkon F and Shaabani A. Essential oil composition of *Nepeta meyeri* Benth. from Iran. *Flavour Frag. J.* 2004; 19 (3): 236 - 8.

18. Nazemiyeh H, Razavi SM, Asnaashari S, Talebpour AH, Ghahramani MA and Imani Y. Chemical composition of the essential oil of *Nepeta menthoides* Boiss & Buhse. *Pharmaceutical Sciences* 2009; 14 (4): 283 - 9.

19. Adiguzel A, Ozer H, Sokmen M, Gulluce M, Sokmen A, Kilic H, Sahin F and Baris O. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. *Pol. J. Microbiol.* 2009; 58 (1): 69 - 76.

20. Alim A, Goze I, Cetin A, Atas AD, Cetinus SA and Vural N. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. Albiflora (Boiss.) gams. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2009; 3 (8): 463 - 7.

21. Nostro A, Cannatelli MA, Crisafi G and Alonzo V. The effect of *Nepeta cataria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2001; 18: 583 - 5.

22. Ozbek Yazici S, Ozmen I, Celikoglu U, Ozcelik H and Genc H. *In vitro* antioxidant activities of extracts from some *Nepeta* species. *Int. J. Health Nutr.* 2012; 3 (1): 8 - 12.

23. Sonboli A, Salehi P and Yousefzadi M. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran. *Z. Naturforsch. C* 2004; 59: 653 - 6.

24. Tepe B, Daferera D, Tepe AS, Polissiou M and Sokmen A. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey. *Food Chem.* 2007; 103: 1358 - 64.

25. Ali T, Javan M, Sonboli A and Semnanian S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. in experimental rat models. *Nat. Prod. Res.* 2012; 26 (16): 1529 - 34.

26. Miceli N, Taviano MF, Giuffrida D, Trovato A, Tzakou O and Galati EM. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 97: 261 - 6.

27. Pavela R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* 2005; 76: 691 - 6.

28. Rabbani M, Sajjadi SE and Mohammadi A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2008; 5 (2): 181 - 6.

29. Ali T, Javan M, Sonboli A and Semnanian S. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi in rats. *DARU* 2012; 20: 48.

30. Uttara B, Singh AV, Zamboni P and Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 2009; 7: 65 - 74.

31. Ozkan G, Sagdic O, Ekici L, Ozturk I and Ozcan MM. Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract, and its antioxidant and antibacterial activities. *J. Food Lipids* 2007; 14: 157 - 69.

32. Kim DO, Jeong SW and Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 2003; 81: 321 - 6.

33. Khalighi-Sigaroodi F, Ahvazi M, Yazdani D and Kashefi M. Cytotoxicity and antioxidant activity of five plant species of Solanaceae family from Iran. *J. Medicinal Plants* 2012a; 11 (43): 41 - 53.

34. Yoo KM, Lee CH, Lee H, Moon B and Lee CY. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chem.* 2008; 106: 929 - 36.

35. Khalighi-Sigaroodi F, Hadjiakhoondi A, Ahvazi M, Taghizadeh M, Yazdani D, Khalighi-Sigaroodi Sh and Bidel S. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. *IJPR* 2012b; 11 (1): 295 - 302.

36. Han J, Weng X and Bi K. Antioxidants from a Chinese medicinal herb - *Lithospermum erythrorhizon*. *Food Chem.* 2008; 106: 2 - 10.

37. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 1999; 26 (9/10): 1231 - 7.

38. Benzie IFF and Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 1996; 239: 70 - 6.

39. Galletti P, Di Gennaro CL, Migliardi V, Indaco S, Ragione FD, Manna C, Chiodini P, Capasso G and Zappia V. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporine cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol. Dial. Transpl.* 2005; 20: 1551 - 8.

40. Adams R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Illinois. 2000.

41. Marriott PJ, Shellie R and Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A* 2001; 93 (6): 1 - 22.

42. Roginsky V and Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 2005; 92: 235 - 54.

43. Apak R, Guclu K, Demirata B, Ozyurek M, Celik SE, Bektasoglu B, Berker KI and Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007; 12: 1496 - 547.

44. Proestos C, Lytoudi K, Mavromelanidou OK, Zoumpoulakis P and Sinanoglou VJ. Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants* 2013; 2: 11 - 22.

45. Tundis R, Nadjafi F and Menichini F. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant properties of *Nepeta crassifolia* Boiss & Buhse and *Nepeta binaludensis* Jamzad. *Phytother. Res.* 2013; 27: 572 - 80.

46. Ghannadi A, Aghazari F, Mehrabani M, Mohagheghzadeh A and Mehregan I. Quantity and composition of the SDE prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *IJPR* 2003; 2: 103 - 5.