بررسی و مقایسهٔ فعالیت زیستی اسانس *Mentha longifolia* L. از مریوان و قزاآن

مرتضی یزدانی[1]، فرشته جوکار کاشی[2*]، اکرم رحیمی‌مقدم[2]

۱. کارشناس ارشد فیتوشیمی، گروه فیتوشیمی، دانشکدهٔ شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
۲. استادیار میکروبیولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۳

چکیده

زمینه و هدف از آنجا که آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدسرطان مصنوعی دارای اثرات نامطلوب بر سلامتی انسان هستند، در این پژوهش فعالیت‌های زیستی اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن بررسی و مقایسه شدند تا جایگزین طبیعی مناسبی برای ترکیبات مصنوعی ذکرشده شناسایی گردد.

مواد و روش‌ها اسانس برگ‌ها و ساقه‌های پونهٔ مریوان و قزاآن با امواج میکروویو و بدون استفاده از حلال استخراج شد. ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌ها با دستگاه کروماتوگرافی گازی ـ طیف‌سنج جرمی شناسایی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها با روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن، سمیت سلولی آن‌ها با آزمون کشندگی میگوی آب شور و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها با روش انتشار در آگار و تعیین کمترین غلظت مهارکنندهٔ رشد بررسی گردید.

یافته‌ها ترکیب اصلی در اسانس پونهٔ مریوان پولگون (۸۱/۴۵٪) و ایزوپولگول (۸/۳۹٪) و در اسانس پونهٔ قزاآن پولگون (۴۸/۲۹٪) و پیپریتنون اکسید (۲۳/۵۳٪) بودند. درصد بازدارندگی اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن و استاندارد BHT به‌ترتیب ۸۰/۰۲٪، ۷۸/۵۹٪ و ۹۵/۵۰٪ و مقدار LC_{50} اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن و داروی ضدسرطان وین‌کریستین‌سولفات به‌ترتیب ۵۳/۴۷، ۵۵/۹۶ و ۰/۷۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن فعالیت ضدمیکروبی خوبی به‌خصوص علیه باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند.

نتیجه‌گیری اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی خوبی هستند و می‌توان آن‌ها را جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدسرطان مصنوعی معرفی کرد.

کلیدواژه‌ها:
پونه، اسانس، فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی.

۱. مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها، ضدسرطان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها سه دسته از مهم‌ترین ترکیبات دارویی هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها منجر به کاهش آسیب بافتی ایجادشده توسط رادیکال‌های آزاد تولیدشده در فرایند اکسیداسیون می‌شوند. اکسیداسیون فرایندی ضروری جهت تولید انرژی در موجودات زنده است؛ اما تعداد زیادی از سیستم‌های آنزیمی در طول متابولیسم طبیعی ـ مصرف اکسیژن ـ رادیکال‌های آزاد واکنشگر را تولید می‌کنند. مقادیر کم رادیکال‌های آزاد اکسیژن جهت انتقال سیگنال و تنظیم رشد مفید هستند؛ اما مقادیر زیاد رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شوند و به بسیاری از مولکول‌ها ازقبیل پروتئین، DNA و لیپیدها حمله می‌کنند [۱].

داروهای برپایهٔ آنتی‌اکسیدان برای پیشگیری و درمان بیماری‌هایی ازقبیل تصلب شرایین، سکته، دیابت، آلزایمر و سرطان ساخته شده‌اند [۲ـ۳]. سرطان از بیماری‌های با درمان دشوار و گاهی غیرقابل علاج است. تعداد زیادی از داروهای

* **نویسندهٔ مسئول: فرشته جوکار کاشی**
نشانی: ایران، کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکدهٔ شیمی، گروه بیوتکنولوژی

تلفن: ۰۹۳۵۲۵۷۵۶۰۴ **دورنگار:**
رایانه: jookar@kashanu.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0002-8332-1269
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0001-6569-5681

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۵، آذر و دی ۱۳۹۸، ص۵۵۴ـ۵۶۵
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

تولیدشده جهت درمان سرطان کارایی لازم را ندارند و در درمان این بیماری هنوز نقص‌هایی وجود دارد.

آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که برای درمان بیماری‌های عفونی تجویز می‌شوند؛ ولی به‌دلیل مصرف بی‌رویه و خودسرانهٔ آن‌ها، بسیاری از پاتوژن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند و آنتی‌بیوتیک‌های موجود کارایی لازم جهت درمان بیماری‌های عفونی را ازدست داده‌اند.

امروزه بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها، ضدسرطان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها با روش‌های شیمیایی تولید می‌شوند. اگرچه تولید این مواد با روش‌های شیمیایی ارزان‌تر و آسان‌تر از روش‌های دیگر است، مواد حاصل مصنوعی هستند و عوارض جانبی زیادی دارند. با توجه به اثرات شدید آنتی‌اکسیدان‌ها، ضدسرطان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی بر سلامتی انسان و آگاهی مصرف‌کنندگان از این موضوع و عدم کارایی مناسب آن‌ها در درمان بیماری‌ها، گرایش به مواد طبیعی، ازجمله گیاهان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی، افزایش یافته و تحقیقات زیادی جهت شناسایی این دسته از گیاهان صورت گرفته است [۴ـ۱۱].

جنس *Mentha* یکی از اعضای مهم خانوادهٔ *Labiatae* است و با شش گونه (M. mozaffarianii، *M. aquatica*، *M. longifolia*، *M. spicata* و *M. suaveolens*) در فلور ایران وجود دارد [۱۲].

Mentha longifolia L. (*M. sylvestris* یا Horse Mint) که در فارسی با نام پونه یا پودنه شناخته می‌شود، گیاهی دارویی و معطر است. در طب سنتی، از پونه به‌عنوان دارویی برای درد معده استفاده می‌شود و ضداسپاسم، ضدآسم و بادشکن و کمک‌کنندهٔ هضم است [۱۳].

در این مطالعه، به‌منظور یافتن جایگزینی طبیعی برای ترکیبات ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و آنتی‌بیوتیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و ضدمیکروبی اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن بررسی و مقایسه شدند.

۲. مواد و روش‌ها

مطالعهٔ حاضر از نوع تجربی است و در پژوهشکدهٔ اسانس‌های طبیعی دانشگاه کاشان انجام گرفت.

۲,۱. تهیهٔ گیاه

در این پژوهش، اندام‌های هوایی مربوط به نمونه‌های گیاه پونه در تابستان سال ۱۳۹۵ از جنوب غربی شهر مریوان واقع در استان کردستان و روستای قزاآن واقع در شمال استان اصفهان جمع‌آوری و توسط استادان گیاه‌شناسی دانشگاه کاشان بررسی و تأیید شدند. نمونه‌ها در دمای اتاق و به مدت ۶ روز خشک و سپس آسیاب شدند.

۲,۲. استخراج اسانس

استخراج اسانس برگ‌ها و ساقه‌های نمونهٔ پونهٔ مریوان و قزاآن با امواج میکروویو و بدون استفاده از حلال انجام شد. به میزان ۱۰۰ گرم از گیاه به مدت یک ساعت در آب خیسانده و با آب‌کشی، آب اضافی آن گرفته شد. سپس مواد گیاهی در یک راکتور میکروویو (مایکروسینت، مایلستن[1]، ایالات متحدهٔ امریکا) در معرض امواج میکروویو قرار گرفتند و استخراج اسانس به مدت ۵ دقیقه با قدرت ۸۵۰ وات در دمای ۸۵ درجهٔ سلسیوس و ۱۰ دقیقه با قدرت ۹۵۰ وات و در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس انجام شد. اسانس استخراج‌شده روی سدیم سولفات بدون آب (مرک، آلمان) خشک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

۲,۳. آنالیز اسانس

دستگاه کروماتوگراف مدل 6890 کوپل‌شده با طیف‌سنج جرمی مدل N-5973 ساخت شرکت آجیلنت[2] دارای ستون موئین HP- 5MS با فاز ساکن متیل فنیل سیلوکسان ۵٪ (طول ۳۰ متر ، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایهٔ ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت جهت شناسایی کیفی اجزا آنالیز شدند. برای برنامه‌ریزی دمایی برای آنالیز، در ابتدا دمای آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد شروع شد و پس از آن با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۲۴۶ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. دمای تزریق‌کننده و دتکتور ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، حجم نمونهٔ تزریقی ۱ میکرولیتر و با split 1/50 و گاز حامل هلیم با سرعت جریان ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود.

ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌ها با مقایسهٔ طیف‌های جرمی و ضرایب بازداری آن‌ها با طیف‌های جرمی و ضرایب بازداری نمونه‌های استاندارد و شاخص‌های موجود در منابع معتبر [۱۴] و بانک اطلاعاتی موجود در دستگاه GC/MS شناسایی شدند. ضرایب بازداری با استفاده از زمان‌های بازداری آلکان‌های نرمال که با همان دستگاه و تحت همان شرایط تزریق شده بودند، محاسبه شدند. مقادیر نسبی ترکیبات اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن‌ها در کروماتوگرام حاصل از GC/MS توسط نرم‌افزار دستگاه محاسبه شد.

۲,۴. سنجش میزان اثر ضداکسیدانی

1. MicroSYNTH, Milestone
2. Agilent

جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها با روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن [۱۵]، ابتدا در یک فلاسک ته‌گرد ۰/۰۲ میلی‌گرم از بتاکاروتن (سیگما آلدریچ، ایالات متحدهٔ امریکا) در ۱ میلی‌لیتر کلروفرم (مرک، آلمان) حل شد. سپس ۲۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید (سیگما آلدریچ، ایالات متحدهٔ امریکا) و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ (مرک، آلمان) به آن اضافه گردید. کلروفرم با روش تبخیر در خلأ و با استفاده از گاز نیتروژن خارج شد و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع از اکسیژن به فلاسک افزوده و محتویات فلاسک هم زده شد تا امولسیون تشکیل شود. ۵ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه‌شده به لولهٔ آزمایش حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر از اسانس یا استاندارد بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) (سیگما آلدریچ، ایالات متحدهٔ امریکا)، انتقال داده و بلافاصله در زمان صفر جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV CINTRA6- GBC Scientific Equipment، ایالات متحدهٔ امریکا) خوانده شد. پس از ۳۰ دقیقه گرماگذاری نمونه‌ها در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، مجدد جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به‌صورت درصد بازدارندگی بی‌رنگ شدن بتاکاروتن با لینولئیک اسید بیان شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I\% = (A_{sample}-A_{control})/(A_{control(0)}-A_{control}) \times 100$$

I% درصد بازدارندگی، A_{sample} جذب نمونه بعد از زمان مورد نظر، Acontrol جذب کنترل بعد از زمان موردنظر و Acontrol(0) جذب کنترل در زمان صفر است.

۲،۵. بررسی سمیت سلولی

جهت بررسی سمیت سلولی اسانس‌ها با آزمون کشندگی میگوی آب شور،[1] ابتدا با حل کردن ۲۳ گرم پودر NaCl (مرک، آلمان)، ۱۱ گرم پودر $MgCl_2$ (مرک، آلمان)، ۴ گرم SO_2Na_4 (مرک، آلمان)، ۱/۳ گرم $CaCl_2$ (مرک، آلمان) و ۰/۷ گرم KCl (مرک، آلمان) در آب مقطر و تنظیم pH آن (pH = 9)، آب شور مناسب برای تبدیل تخم آرتمیا به لارو و ادامهٔ زندگی آن‌ها تهیه گردید و به مدت چند دقیقه جوشانده شد تا استریل شود. جهت تهیهٔ لارو، ۳۰۰ میلی‌لیتر از آب شور و ۰/۰۵ گرم از تخم آرتمیا به ظرف مناسبی اضافه گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هوادهی مناسب به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. مقدار ۰/۰۵ گرم از اسانس به بالن ژوژهٔ ۲۵ میلی‌لیتری اضافه و با استفاده از ۱۲۵ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (مرک، آلمان) حل شد و با آب شور به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس محلول‌های با غلظت ۱۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه شد. برای تهیهٔ کنترل منفی ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید به بالن ژوژهٔ ۵ میلی‌لیتری اضافه و با آب شور به حجم رسانده شد. از داروی ضدسرطانی وین‌کریستین‌سولفات (جیدون ریشتر،[2] مجارستان) با غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۳۵، ۰/۴۵، ۰/۷۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان شاهد استفاده شد. به هریک از لوله‌های آزمایش حاوی محلول‌های شاهد، کنترل منفی و اسانس، با استفاده از پیپت پاستور ۱۰ لارو آرتمیا اضافه و محلول‌های تهیه‌شدهٔ حاوی لارو آرتمیا در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور مناسب به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شد. پس از ۲۴ ساعت، تعداد لاروهای زنده شمارش و درصد کشندگی با معادلهٔ زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد کشندگی} = \frac{(\text{تعداد لارو زنده موجود در نمونه} - \text{تعداد لارو زنده موجود در شاهد})}{\text{تعداد لارو زنده موجود در شاهد}} \times 100$$

سپس نموداری از نسبت درصد کشندگی به غلظت رسم شد و میزان LC_{50}، یعنی غلظتی از نمونه که درصد کشندگی ۵۰ را داشت، براساس میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. به‌منظور به‌حداقل رساندن خطاهای آزمایش و اطمینان از صحت نتایج، آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار شد.

۲،۶. سنجش میزان فعالیت ضدمیکروبی

۲،۶،۱. میکروارگانیسم‌ها

میکروارگانیسم‌های بررسی‌شده در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737)، *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) و *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)، باکتری‌های گرم منفی *Shigella dysenteriae* (PTCC 1188)، *Klebsiella pneumonia* (ATCC 10031)، *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)، *Salmonella paratyphi-A serotype* (ATCC 5702)، *Escherichia coli* (ATCC 10536) و *Proteus vulgaris* (PTCC 1182) و قارچ‌های *Aspergillus niger* (ATCC 16404)، *Aspergillus brasiliensis* (PTCC 5011) و *Candida albicans* (ATCC 10231) بودند. سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

1. brine shrimp lethality test
2. Gedeon Richter

برای کشت باکتری‌ها از محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) و برای کشت قارچ‌ها از محیط کشت سابرو دکستروز آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و قارچ‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک شب در گرم‌خانه گرماگذاری شدند.

روش انتشار در آگار (DD): جهت تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها از روش انتشار در آگار مطابق دستور کار مؤسسهٔ استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد [۱۶]. به این منظور پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) برای باکتری‌ها و سابرو دکستروز آگار برای قارچ‌ها تهیه شد. اسانس نیز در دی‌متیل‌سولفوکسید حل و با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد. از کشت ۲۴ساعتهٔ باکتری‌ها و قارچ‌ها سوسپانسیون‌هایی با کدورت معادل نیم‌مک‌فارلند تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها به‌صورت یک‌نواخت در سطح محیط کشت‌ها، کشت داده شد. چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر و به ضخامت ۴ میلی‌متر در محیط کشت‌ها ایجاد شد. به هریک از چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر از اسانس با غلظت نهایی ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. به‌منظور تعیین حساسیت سویه‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و جنتامایسین (برای باکتری‌ها) (پادتن طب، ایران) و نیستاتین (برای قارچ‌ها) (پادتن طب، ایران) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پلیت‌های تلقیح‌شده با باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت تلقیح‌شده با مخمر به مدت ۴۸ ساعت و پلیت‌های تلقیح‌شده با سایر قارچ‌ها به مدت ۷۲ ساعت در گرم‌خانه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس قطر هالهٔ مهار رشد توسط خط‌کش اندازه‌گیری و ثبت شد. برای اطمینان از نتایج، هر آزمایش ۳ بار تکرار و میانگین داده‌های به‌دست‌آمده به‌عنوان قطر هالهٔ مهار رشد گزارش شد.

۲،۶،۲. تعیین کمترین غلظت مهارکنندهٔ رشد (MIC) با روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع

به‌منظور تعیین MIC سویه‌های باکتریایی استاندارد حساس به اسانس از پلیت ۹۶خانه‌ای استریل و روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع طبق دستور کار CLSI استفاده گردید [۱۶]. به هریک از خانه‌های پلیت ۹۶خانه‌ای ۲۰۰ میکرولیتر محلول شامل ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مایع برین هارت اینفیوژن (BHI) (مرک، آلمان)، ۱۰۰ میکرولیتر از یکی از غلظت‌های اسانس (۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی یا قارچی با رقت معادل نیم‌مک‌فارلند افزوده شد. چاهک‌های مربوط به کنترل منفی فاقد محلول اسانس و حاوی ۱۹۵ میکرولیتر از محیط کشت BHI و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با رقت معادل نیم‌مک‌فارلند بودند. از پودر آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و جنتامایسین (سیگما، ایالات متحدهٔ امریکا) جهت تهیهٔ کنترل مثبت استفاده گردید. چاهک‌های مربوط به کنترل مثبت حاوی ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مایع BHI، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با رقت معادل نیم مک‌فارلند و ۱۰۰ میکرولیتر از یکی از غلظت‌های آنتی‌بیوتیک (۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بودند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه گرماگذاری شدند. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و میانگین کمترین غلظت از اسانس که مانع رشد باکتری‌ها شده بود، به‌عنوان MIC درنظر گرفته شد.

۲،۶،۳. تعیین MIC با روش رقت‌سازی در آگار

به‌منظور تعیین MIC سویه‌های قارچی استاندارد حساس به اسانس از روش رقت‌سازی در آگار طبق دستور کار گول[1] و همکاران [۱۷] استفاده شد. مقادیر مناسبی از اسانس‌های استریل‌شده به محیط کشت سابرو دکستروز آگار مذاب استریل حاوی توئین ۲۰ (۰/۵٪ حجمی/ حجمی) (مرک، آلمان) اضافه گردید تا محیط کشت‌های با غلظت‌های ۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس‌ها ایجاد شود. محلول محیط کشت و اسانس هم زده شد و در پلیت‌ها توزیع گردید. پلیت‌ها به‌صورت نقطه‌ای با ۵ میکرولیتر از جدایه‌های قارچی (10^4 اسپور بر میلی‌لیتر) تلقیح شدند. از پودر آنتی‌بیوتیک نیستاتین (سیگما، ایالات متحدهٔ امریکا) جهت تهیهٔ کنترل مثبت استفاده گردید و کنترل منفی پلیت حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار و توئین ۲۰ (۰/۵٪ حجمی/ حجمی) و فاقد اسانس بود. پلیت‌های تلقیح‌شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و میانگین کمترین غلظت از اسانس که مانع رشد قارچ‌ها شده بود، به‌عنوان MIC درنظر گرفته شد.

۳. یافته‌های پژوهش

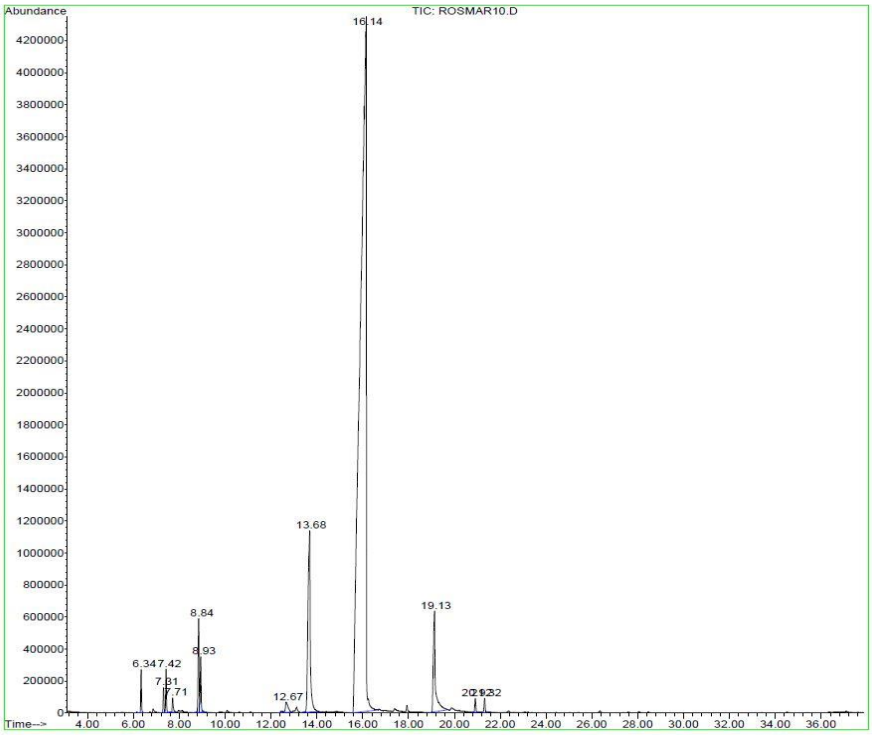
۳،۱. بازده اسانس‌گیری

بازده استخراج اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن با امواج میکروویو و

1. Gul

بدون استفاده از حلال به‌ترتیب ۱/۳۵٪ و ۰/۹۱٪ بود.

آنالیز اسانس: شکل ۱ و ۲ کروماتوگرام حاصل از GC-MS را به‌ترتیب برای اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن نشان می‌دهد.

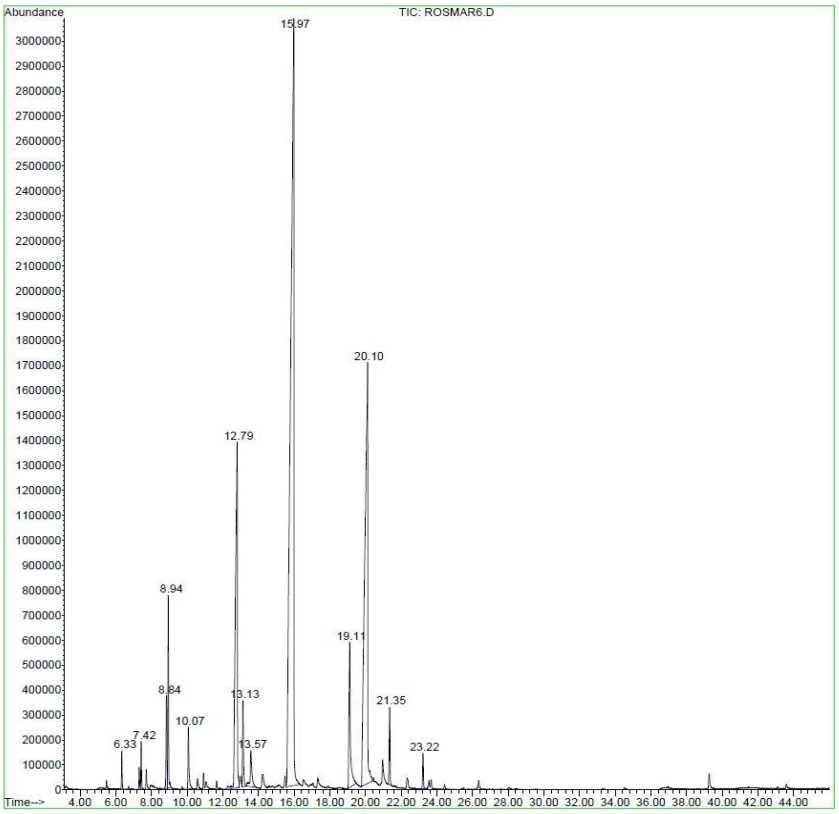


شکل ۱. کروماتوگرام اسانس گیاه پونهٔ مریوان به‌دست‌آمده از دستگاهGC-MS

جدول ۱. ترکیب درصد اجزای فرار در اسانس پونهٔ مریوان

شماره	نام ترکیب	زمان بازداری	درصد
۱	alpha-Pinene	۶/۳۴	۰/۶۴
۲	Sabinene	۷/۳۱	۰/۳۹
۳	beta-Pinene	۷/۴۲	۰/۶۸
۴	beta-Myrcene	۷/۷۱	۰/۲۹
۵	dl-Limonene	۸/۸۴	۱/۷۶
۶	1,8-Cineole	۸/۹۳	۰/۹۵
۷	Isopulegol	۱۳/۶۹	۸/۳۹
۸	Pulegone	۱۶/۱۵	۸۱/۴۵
۹	Piperitenone	۱۹/۱۳	۴/۳۰
۱۰	Isocaryophyllen	۲۰/۹۱	۰/۲۷
۱۱	trans-Caryophyllene	۲۱/۳۲	۰/۲۹
	جمع کل		۹۹/۴۱

نتایج آنالیز اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن به‌ترتیب در جدول ۱ و ۲ آمده است. در اسانس پونهٔ مریوان ۱۱ ترکیب شناسایی شد و اجزای اصلی پولگون (۸۱/۴۵٪)، ایزوپولگول (۸/۳۹٪) و پیپریتنون (۴/۳۰٪) بودند که ۹۴/۱۴٪ از اسانس را تشکیل دادند. در اسانس پونهٔ قزاآن ۱۳ ترکیب شناسایی شد و اجزای اصلی پولگون (۴۸/۲۹٪)، پیپریتنون اکسید (۲۳/۵۳٪)، 2-(t-Butyl)-3-methylthiophene (۱۳/۰۶٪)، پیپریتنون (۴/۱۷٪) و ۱ و ۸- سینئول (۲/۶۰٪) بودند و این ۵ ترکیب تشکیل‌دهندهٔ ۹۱/۶۵٪ از ترکیب‌های اسانس بودند.



شکل ۲. کروماتوگرام اسانس گیاه پونهٔ قزاآن به‌دست‌آمده از دستگاهGC-MS

جدول ۲. ترکیب درصد اجزای فرار در اسانس پونهٔ قزاآن

شماره	نام ترکیب	زمان بازداری	درصد
۱	alpha-Pinene	۶/۳۴	۰/۴۴
۲	beta-Pinene	۷/۴۲	۰/۶۰
۳	dl-Limonene	۸/۸۴	۱/۴۳
۴	1,8-Cineole	۸/۹۴	۲/۶۰
۵	p-Mentha-3,8-diene	۱۰/۰۶	۱/۲۱
۶	2-(t-Butyl)-3-methylthiophene	۱۲/۷۹	۱۳/۰۶
۷	Menthofuran	۱۳/۱۳	۱/۶۶
۸	Isopulegol	۱۳/۵۷	۱/۲۱
۹	Pulegone	۱۵/۹۷	۴۸/۲۹
۱۰	Piperitenone	۱۹/۱۱	۴/۱۷
۱۱	Piperitenone oxide	۲۰/۱۰	۲۳/۵۳
۱۲	trans-Caryophyllene	۲۱/۳۵	۱/۲۳
۱۳	Germacrene-D	۲۳/۲۲	۰/۵۷
	جمع کل		۱۰۰

۳،۲. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن براساس بی‌رنگ شدن رقابتی بتاکاروتن طی آنتی‌اکسیداسیون لینولئیک اسید در امولسیون آبی است و با کاهش جذب در ناحیهٔ مرئی بررسی می‌شود [۱۵]. در غیاب ترکیبات آنتی‌اکسیدان، لینولئیک اسید اکسید و رادیکال‌های آزاد پروکسیل تولیدشده، بتاکاروتن اشباع‌نشده را اکسید و تجزیه می‌کند و رنگ نارنجی بتاکاروتن کاهش می‌یابد [۱۸]. حضور آنتی‌اکسیدان‌ها، اکسیداسیون بتاکاروتن با هیدروپراکسیدها را کاهش می‌دهد و هیدروپراکسیدهای تشکیل‌شده توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان خنثی می‌شوند.

بنابراین میزان بی‌رنگ شدن بتاکاروتن به فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب بررسی‌شده بستگی دارد [۱۹].

براساس نتایج آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن، درصد بازدارندگی اسانس پونهٔ مریوان، اسانس پونهٔ قزاآن و استاندارد BHT به‌ترتیب ۸۰/۰۲٪، ۷۸/۵۹٪ و ۹۵/۵۰٪ به‌دست آمد که نشان می‌دهد اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی دارند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونهٔ مریوان بیشتر از اسانس پونهٔ قزاآن است.

۳،۳. میزان سمیت سلولی

یکی از آزمون‌های معتبر جهت یافتن ترکیبات دارای ویژگی سمیت سلولی، آزمون کشندگی میگوی آب شور (BST) است. اساس این آزمون، توانایی نمونهٔ مورد آزمایش در کشتن آرتمیا است. بنابراین با محاسبهٔ میزان کشندگی در غلظت‌های معیّن از نمونهٔ اسانس و مقایسهٔ آن با استاندارد منفی، اثر ضدسرطانی اسانس پیش‌بینی می‌شود. در این مطالعه، مقدار LC_{50} برای اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن و داروی ضدسرطان وین کریستین سولفات به‌ترتیب ۵۳/۴۷، ۵۵/۹۶ و ۰/۷۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد که نشان می‌دهد سمیت سلولی اسانس پونهٔ مریوان بیشتر از اسانس پونهٔ قزاآن است.

۳،۴. میزان فعالیت ضدمیکروبی

نتایج آزمون‌های DD و MIC اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن و کنترل مثبت‌ها در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳. بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن

میکروارگانیسم‌ها	اسانس برگ‌ها و ساقه‌های پونهٔ مریوان		اسانس برگ‌ها و ساقه‌های پونهٔ قزاآن		Rifampin		Gentamicin		Nystatin	
باکتری‌های گرم مثبت	DD (mm)	MIC (µg/ml)	DD (mm)	MIC (µg/ml)	DD (mm)	MIC (µg/ml)	DD (mm)	MIC (µg/ml)	DD (mm)	MIC (µg/ml)
S. epidermidis	۱۳	۶۲/۵	۱۰	۲۵۰	۴۰	۲۵۰	۳۵	۵۰۰	NA	NA
B. subtilis	۱۱	۱۲۵	۱۲	۱۲۵	۱۳	۱۵/۶	۲۱	۵۰۰	NA	NA
S. aureus	-	-	-	-	۱۰	۲۵۰	۲۱	۵۰۰	NA	NA
باکتری‌های گرم منفی										
S. dysenteriae	-	-	۱۱	۲۵۰	۸	۲۵۰	۱۸	۵۰۰	NA	NA
K. pneumonia	-	-	-	-	۷	۲۵۰	۲۲	۲۵۰	NA	NA
P. aeruginosa	۱۳	۳۱/۲۵	-	-	-	-	۸	۵۰۰	NA	NA
S. paratyphi-A serotype	-	-	-	-	-	-	۲۱	۵۰۰	NA	NA
E. coli	-	-	-	-	۱۱	۵۰۰	۲۱	۵۰۰	NA	NA
P. vulgaris	-	-	-	-	۱۰	۱۲۵	۲۳	۵۰۰	NA	NA
قارچ‌ها										
A. niger	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	۲۷	۳۱/۲۵
A. brasilienis	-	-	۱۵	۳۱/۲۵	NA	NA	NA	NA	۳۰	۳۱/۲۵
C. albicans	۱۰	۲۵۰	-	-	NA	NA	NA	NA	۳۳	۱۲۵

A dash (-) indicate no antimicrobial activity
not applicable:NA

براساس نتایج آزمون DD و MIC، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونهٔ مریوان به‌ترتیب علیه باکتری‌های *P. aeruginosa*، *S. epidermidis*، *B. subtilis* و قارچ *C. albicans* و بیشترین فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونهٔ قزاآن به‌ترتیب علیه قارچ *A. brasilienis* و باکتری‌های *B. subtilis*، *S. dysenteriae* و *S. epidermidis* بود. برمبنای این نتایج، اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن علیه باکتری‌های گرم مثبت تأثیر بیشتری داشته‌اند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن با روش یکسانی استخراج شدند؛ ولی بازده استخراج اسانس پونهٔ مریوان (۱/۳۵٪) بیشتر از بازده استخراج اسانس پونهٔ قزاآن (۰/۹۱٪) بود. در هر دو نمونه اسانس، پولگون به‌عنوان ترکیب اصلی شناسایی شد؛ ولی مقدار آن در اسانس پونهٔ مریوان بیشتر بود. ایزوپولگول نیز در هر دو نمونه اسانس یافت شد؛ اما مقدار آن در اسانس پونهٔ مریوان بیشتر بود. پیپریتنون اکسید و 2-(t-Butyl)-3-methylthiophene درصد بالایی از اسانس پونهٔ قزاآن را

تشکیل دادند؛ ولی در اسانس پونهٔ مریوان یافت نشدند. در برخی مطالعات [۴-۵] دیگر نیز، پولگون ترکیب اصلی اسانس پونه گزارش شده است. برخی مطالعات نیز ترکیبات دیگری را به‌عنوان ترکیب اصلی معرفی کرده‌اند. ترکیب اصلی اسانس پونهٔ جمع‌آوری‌شده از آفریقای جنوبی، شهمیرزاد سمنان، صربستان و خراسان به‌ترتیب منتون (۲۸٪)، سیس پیپریتون اپوکسید (۲۸/۲۳٪)، ترانس ـ دی ـ هیدروکارون (۲۳/۶۴٪) و کارون (۳۲٪) بودند [۶-۹]. بازده اسانس‌ها، نوع و درصد ترکیبات موجود در اسانس‌ها به منطقهٔ جغرافیایی، میزان رطوبت، نور، دمای محیط، ارتفاع از سطح دریا، میزان بارندگی، ترکیب خاک، سن گیاه و روش استخراج بستگی دارد. براساس نتایج این پژوهش، اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونهٔ مریوان (۸۰/۰۲٪) تقریبا ۱/۵٪ بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونهٔ قزاآن (۷۸/۵۹٪) بود. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونهٔ مصر ۴۵٪ [۵] و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونهٔ شهمیرزاد سمنان ۶۰٪ [۷] به‌دست آمد. با مقایسهٔ این نتایج متوجه می‌شویم که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه‌های بررسی‌شده در مطالعات قبلی است. در این مطالعه، سمیت سلولی خوبی در اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن مشاهده شد و سمیت سلولی اسانس پونهٔ مریوان (۵۳/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کمی بیشتر از سمیت سلولی اسانس پونهٔ قزاآن (۵۵/۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. اکو[1] و همکاران [۶] سمیت سلولی اسانس پونهٔ آفریقای جنوبی را با آزمون کشندگی میگوی آب شور تعیین و مقدار LC_{50} را ۵۴/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. در برخی مطالعات [۱۰-۱۱]، اثر سمیت سلولی اسانس پونه علیه رده‌های سلولی مختلف با روش MTT[2] بررسی شده و مقدار IC_{50} اسانس علیه رده‌های سلولی Vero، Hela، Hep2، MCF-7 و LNCaP به‌ترتیب ۳۶/۸، ۳۵/۹، ۹۴/۳، ۴۵/۲ و ۴۳/۵ به‌دست آمده است. اسانس پونهٔ مریوان فعایت ضدمیکروبی خوبی برضد باکتری‌های گرم مثبت *B. subtilis* (DD = 11 mm, MIC = 125 µg/ml)، *S. epidermidis* (DD = 13 mm, MIC = 62.5 µg/ml)، باکتری گرم منفی P. *aeruginosa* (DD = 13 mm, MIC = 31.25 µg/ml) و قارچ *C. albicans* (DD = 10 mm, MIC = 250 µg/ml) نشان داد. اسانس پونهٔ قزاآن نیز فعایت ضدمیکروبی خوبی علیه باکتری‌های گرم مثبت *B. subtilis* (DD = 12 mm, MIC = 125 µg/ml)، *S. epidermidis* (DD = 10 mm, MIC = 250 µg/ml)، باکتری گرم منفی *S. dysenteriae* (DD = 11 mm, MIC = 250 µg/ml) و قارچ *A. brasilienis* (DD = 15 mm, MIC = 31.25 µg/ml) داشت. اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن فعالیت ضدمیکروبی علیه *P. vulgaris*، *A. niger* و *S. aureus* و *E. coli* نشان ندادند. اسانس پونهٔ قزاآن فعالیت ضدقارچی بهتر و اسانس پونهٔ مریوان فعالیت ضدباکتریایی بهتری را نمایان کرد. مقدار MIC اسانس پونه علیه میکروارگانیسم‌های *S. aureus*، *P. aeruginosa*، P. *vulgaris*، *A. niger* و *C. albicans* در مطالعات دیگر [۴، ۸-۹] به‌ترتیب ۷۵، ۱۴/۵، ۲۹، ۲/۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. در مطالعهٔ حسین[3] و همکاران [۱۱] قطر هالهٔ عدم رشد میکروارگانیسم‌های *S. aureus*، *B. subtilis*، *E. coli* و *A. niger* اطراف دیسک حاوی اسانس پونه به‌ترتیب ۳۱، ۲۹، ۱۶ و ۲۸ میلی‌متر و MIC اسانس پونه علیه میکروارگانیسم‌های ذکرشده به‌ترتیب ۳۲/۳، ۴۵/۹، ۳۲۰/۳ و ۸۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. در مطالعهٔ النساری[4] و همکار [۵] قطر هالهٔ عدم رشد *B. subtilis* و *S. aureus* اطراف دیسک حاوی اسانس پونه (قطر ۵ میلی‌متر و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۱۰ و ۱۰ میلی‌متر و MIC برای هر دو باکتری کمتر از ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ترکیب اصلی اسانس پونهٔ مریوان پولگون و ترکیبات اصلی اسانس پونهٔ قزاآن پولگون و پیپریتنون اکسید هستند. به‌نظر می‌رسد خاصیت آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و ضدمیکروبی اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن به‌دلیل وجود مونوترپن‌های اکسیژنه به‌ویژه پولگون و پیپریتنون اکسید باشد و تفاوت در مقدار این ترکیبات در اسانس پونهٔ مریوان و قزاآن سبب شده خواص آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و ضدمیکروبی آن‌ها تاحدودی متفاوت باشد. براساس نتایج پژوهش‌های قبلی [۲۰-۲۲]، مونوترپن‌هایی ازقبیل پولگون و پیپریتنون اکسید می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی داشته باشند. برخی از مطالعات [۲۳ـ۲۴] نیز سمیت سلولی اسانس را به پولگون نسبت داده‌اند. مونوترپن‌های اکسیژنهٔ موجود در طبیعت چربی‌دوست هستند و نقش خود را در غشای سلولی ایفا می‌کنند و باعث آسیب‌های ریخت‌شناسی زیادی می‌شوند که درنهایت سبب تغییر نفوذپذیری غشا و آزاد شدن محتویات سلولی می‌شوند [۲۵] و

1. Okoh
2. microculture tetrazolium/ formazan
3. Hussain
4. Elansary

به همین دلیل می‌توانند خاصیت ضدمیکروبی زیادی را نشان دهند. محمودی و همکاران [۴] خاصیت ضدباکتریایی اسانس پونه را به ترکیبات فعال مونوترپنی به‌ویژه پولگون، منتول و ۱ و ۸- سینئول نسبت داده‌اند. در مطالعات [۲۶ـ۲۷] دیگر هم، خاصیت ضدمیکروبی اسانس پونه به مونوترپن‌های اکسیژنه ازقبیل پولگون، منتون و نئومنتون نسبت داده شده است.

براساس نتایج این پژوهش، اسانس‌های پونهٔ مریوان و قزاآن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی هستند و می‌توان آن‌ها را جایگزینی طبیعی برای آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدسرطان مصنوعی معرفی کرد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی اسانس پونهٔ مریوان بیشتر از اسانس پونهٔ قزاآن بود. فعالیت‌های زیستی مشاهده‌شده در اسانس‌ها را می‌توان به مونوترپن‌های اکسیژنه به‌ویژه پولگون و پیپریتنون اکسید نسبت داد؛ اگرچه تحقیقات بیشتری لازم است تا نقش هریک از مواد تشکیل‌دهندهٔ اسانس در ایجاد خواص ذکرشده تعیین گردد.

قدردانی و تشکر

این پژوهش با کد اخلاق ۱۳۹۴۷۰۸ در دانشگاه کاشان به‌ثبت رسیده است. بدین وسیله از پژوهشکدهٔ اسانس دانشگاه کاشان که مواد، وسایل و امکانات لازم جهت انجام دادن این پژوهش را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

[1]. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University press; 1999. p. 617-783.
[2]. Mantle D, Eddeb F, Pickering AT. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. J Ethnopharmacol 2000;72(1-2):47- 51. PubMed
[3]. Koleva II, Van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Eustatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochem Anal 2002; 13(1): 8-17. PubMed
[4]. Mahmodi R, Tajik H, Farshid AA, Ehsani A, Zaree P, Moradi M. Phytochemical properties of *Mentha longifolia* L. essential oil and its antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*. Armaghane Danesh Journal 2011; 16(5): 400-412. (persian) Link
[5]. Elansary HO, Ashmawy NA. Essential Oils of Mint between Benefits and Hazards. Journal of essential oil-bearing plants JEOP 2013; 16 (4): 429-38. Link
[6]. Okoh OO, Afolayan AJ. 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*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2011; 5(22): 2474-2478. Link
[7]. Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi AH, Jebelli Javan A, Sadeghi T, Zeagham Monfared MM. In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity of Iranian *Mentha Longifolia* Essential Oil and Extracts. Journal of medicinal plants 2012; 1(41): 185-94. (persian) Link
[8]. Džamić AM, Soković MD, Ristić MS, Novaković M, Grujić-Jovanović S, Tešević V, et al. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. Botanica Serbica 2010; 34 (1): 57-62. Link
[9]. Maleki M, Gandomkar E, Sarfarazi Moghadam Z, Mohamadi Sani A. Chemical composition and antimicrobial effect of the essential oil of *Mentha longifolia* L. BTAIJ 2015; 11(3): 90-93. Link
[10]. Rahimifard N, Hajimehdipoor H, Hedayati MH, Bagheri O, Pishehvar H, Ajani Y. Cytotoxic Effects of Essential Oils and Extracts of some Mentha species on Vero, Hela and Hep2 Cell Lines. Journal of Medicinal Plants 2010; 3(35): 88-92. Link
[11]. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. J Sci Food Agric 2010; 90(11): 1827-36. PubMed
[12]. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran: Farhang Moaser Publishers; 1996. P. 344-45. (persian)
[13]. Viljoen AM, Petkar S, Vuuren SF, Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso JG. The chemo-Geographica variation in essential oil compositon and the antimicrobial propertied of wild Mint *Mentha longifolia* subsp. Polyadena (Lamiaceae) in southern Africa. J Essent Oil Res 2006; 18: 60-65. Link
[14]. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadruple mass spectroscopy. 4th ed. Carol Stream IL: Allured Publishing Cropration; 2007.
[15]. Miller HE. A simplified method for evaluation of antioxidant. J Am Oil Chem Soc 1971; 48(2): 91. Link
[16]. CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Approved standard: National Committee for Clinical Laboratory Standards 2012; 29(1): 1-76.
[17]. Gul HI, Ojanen T, Hänninen O. Antifungal evaluation of bis Mannich bases derived from acetophenones and their corresponding piperidinols and stability studies. Biol Pharm Bull 2002; 25(10): 1307-310. PubMed
[18]. Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food Chemistry 2006; 97(1): 109-114. Link
[19]. Ismail M, Mariod A, Bagalkotkar G, Ling HS. Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of Cantaloupe extracted by supercritical fluid extraction. Grasas y Aceites 2010; 61(1): 37-44. Link
[20]. Jalilzadeh-Amin G, Maham M, Dalir-Naghadeh B, Kheiri F. Effects of *Mentha longifolia* essential oil on ruminal and abomasal longitudinal smooth muscle in sheep. J Essent Oil Res 2012; 24(1): 61-69. Link
[21]. Turner GW, Croteau R. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. Plant Physiol 2004; 136(4): 4215-4227. PubMed
[22]. Nikšić H, Kovač-Bešović E, Makarević E, Durić K. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mentha longifolia* (L.) Huds. essential oil. Journal of Health Sciences 2012; 2(3): 192-200. Link
[23]. Yousefbeyk F, Tabaside J, Ostad SN, Salehi Sourmagh MH, Amin GR. Investigation of chemical composition and cytotoxic activity of aerial parts of *Ziziphora clinopodioides* Lam. Research Journal of Pharmacognosy (RJP) 2016; 3(2): 47-51. Link
[24]. Da Rocha MS, Dodmane PR, Arnold LL, Pennington KL, Anwar MM, Adams BR, et al. Mode of action of pulegone on the urinary bladder of F344 rats. Toxicol Sci. 2012: 128(1): 1-8. PubMed

[25]. Moosavy MH, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Mousavi HA, et al. Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacteria cell membranes. Food Res Int 2008; 41(10): 1050-57. Link
[26]. Nobakht A, Norani J, Safamehr A. The effects of different amounts of *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) on performance, carcass traits, hematological and blood biochemical parameters of broilers. Journal of Medicinal Plants Research 2011; 5(16): 3763-68. Link
[27]. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, et al. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products 2012; 36(1): 81-87. Link.

Comparative Evaluation of Essential Oil Bioactivities of *Mentha longifolia* L. from Marivan and Qaza An

Morteza Yazdani[1], Fereshteh Jookar Kashi[2*], Akram Rahimi-Moghaddam[2]

1. MSc, Department of Phytochemistry, Faculty of Chemistry, university of Kashan, Kashan, Iran
2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Chemistry, university of Kashan, Kashan, Iran

Abstract

Introduction: Considering the adverse effects of synthetic antioxidants, anticancer drugs and antibiotics on human health, in this study, bioactivities of *Mentha longifolia* L. essential oils collected from Marivan and Qaza An were examined and compared with each other for identification a natural alternative of synthetic antioxidants, anticancer drugs and antibiotics.

Methods: Essential oil of *M. longifolia* leaves and stems collected from Marivan and Qaza An was prepared using solvent-free microwave extraction method. The essential oil components were identified by gas chromatography/mass spectrometry. The antioxidant and cytotoxicity activity of the essential oils were determined via β–carotene bleaching assay and brine shrimp lethality test, respectively. The antimicrobial activity of the essential oils was evaluated by the agar well diffusion method and by determination of minimum inhibitory concentration.

Results: The main components of *M. longifolia* essential oil collected from Marivan were pulegone (81.45%) and isopulegol (8.39%) and the main components of *M .longifolia* essential oil collected from Qaza An were pulegone (48.29%) and piperitenone oxide (23.53%). The inhibition of linoleic acid oxidation by *M. longifolia* essential oils collected from Marivan, Qaza An and BHT were 80.02%, 78.59% and 95.50%, respectively. The LC_{50} of the *M. longifolia* essential oils collected from Marivan, Qaza An and vincristine sulfate were 53.47µg/ml, 55.96 µg/ml and 0.751 µg/ml, respectively. *M. longifolia* essential oils had good antimicrobial activity, especially against gram-positive bacteria.

Conclusion: *M. longifolia* essential oils have significant antioxidant, antimicrobial and anticancer activity and can be introduced as alternatives of synthetic antioxidants, antibiotics and anti-cancer drugs.

Received: 2018/08/13
Accepted: 2018/11/04

Keywords: *Mentha longifolia* L., Essential oil, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Cytotoxicity.