مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات ۱۵۴-۱۴۵

اسیدهای فنولی، فعالیت ضدرادیکالی و ضدمیکربی عصاره متانولی برگ‌های اوجی

شهلا سلمانیان[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، مرتضی خمیری[۳]، محمدرضا ماستری فراهانی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
پست الکترونیکی: sadeghiaz@yahoo.com
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۴- استادیار گروه تکنولوژی و مهندسی چوب، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: گیاه اوجی یکی از گونه‌های مهم خانواده نعنا است که توزیع گسترده‌ای در مناطق شمال ایران دارد. هدف از این پژوهش ارزیابی فعالیت پاداکسایشی، ضدمیکربی و آنالیز اسیدهای فنولی عصاره متانولی گیاه دارویی اوجی است.

مواد و روش‌ها: مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره متانولی با روش فولین سیوکالتو، فعالیت ضد میکربی عصاره به روش رقیق‌سازی در مایع با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی، مقدار اسیدهای فنولی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و فعالیت پاداکسایشی عصاره با آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH تعیین گردید.

یافته‌ها: در تمام غلظت‌ها (۲۰۰،۱۵۰،۵۰،۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره اوجی از فعالیت پاداکسایشی بالایی برخوردار بود و با افزایش غلظت، میزان فعالیت مهار کنندگی افزایش یافت (۸۷/۲۳- ۲۶/۴۶ درصد). همچنین عصاره فعالیت ضدمیکربی قابل ملاحظه‌ای در مقابل چهار باکتری مورد بررسی (*باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سالمونلا انتریکا*) نشان داد. بیشترین اثر باکتری‌کشی عصاره مربوط به *سالمونلا انتریکا* (MBC= ۲/۵mg/g) بود. درحالی که *اشریشیا کلی* قوی‌ترین باکتری به عصاره شناخته شد (MBC= ۴۰mg/g). فراوان‌ترین اسید فنولی موجود در برگ‌های اوجی کلروژنیک اسید بود که میزان آن ۷۳۲/۸۴ میکروگرم بر گرم بافت خشک گیاه تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی برگ‌های اوجی می‌تواند جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی جهت کنترل رشد میکربی و افزایش عمر نگهداری مواد غذایی باشد.

واژگان کلیدی: کلروژنیک اسید، فعالیت ضدمیکربی، فعالیت ضدرادیکالی، گیاه دارویی اوجی، ترکیبات فنولی

• مقدمه

امروزه به طور فزاینده‌ای افزودنی‌های شیمیایی، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنعت مواد غذایی به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها و آلودگی مواد غذایی و نیز به تأخیر انداختن فرایند اکسایش و افزایش عمر نگهداری فراورده‌های غذایی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌رغم پیشرفت‌های نوین در روش‌های تولید و نگهداری مواد غذایی هنوز ایمنی غذا و توانایی زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها در فرآورده‌های غذایی، مشکل جدی محسوب می‌گردد، بنابراین کنترل میکروارگانیسم‌ها و به حداقل رساندن آسیب‌های وارده میکربی به مواد غذایی بسیار حائز اهمیت است. در چند سال اخیر به دلیل گسترش سویه‌های میکربی مقاوم به داروها و آنتی بیوتیک‌ها و نیز افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان جهت تولید فراورده‌های غذایی عاری از نگهدارنده‌ها و افزودنی‌های شیمیایی و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

سنتزی، تحقیقات در خصوص شناسایی منابع جدید و بالقوه از ترکیبات طبیعی با خاصیت پاداکسایشی و ضدمیکربی افزایش یافته است. تحقیقات نشان داده است که گیاهان دارویی مختلف حاوی ترکیبات زیست فعال بالقوه با عملکرد پاداکسایشی و خاصیت ضدمیکربی بدون اثرات جانبی بر سلامتی می‌باشند. از این رو جایگزین مناسبی برای ترکیبات شیمیایی و سنتزی در صنعت غذا و دارو محسوب می‌شوند (۲، ۱).

پلی‌فنول‌ها متابولیت‌های ثانویه فعال گیاهی هستند که به فراوانی در میوه‌ها، دانه‌ها و برگ‌ها یافت می‌شوند. این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت پاداکسایشی قوی در زمینه مهار گونه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن، کلرین، آنیون سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیل، هیپوکلروس اسید و پراکسی نیتروس اسید نشان داده‌اند. همچنین این ترکیبات قادر به چنگالی کردن یون‌های فلزی و در نتیجه کاهش فعالیت پرواکسیدانی این یون‌ها می‌باشند (۳). فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی مهم‌ترین گروه‌های پلی‌فنولی را تشکیل می‌دهند. اسیدهای فنولی عمده در گیاهان مشتقات هیدروکسیل شده بنزوئیک و سینامیک اسیدها می‌باشند. هیدروکسی سینامیک اسیدها به فراوانی در اغلب گیاهان یافت می‌شوند، اما میزان هیدروکسی بنزوئیک اسید گیاهان خوراکی به طور کلی بسیار پایین است. به دلیل مزیت‌های سلامتی بخش اسیدهای فنولی، تحقیقات بر روی این ترکیبات گیاهی در چند سال اخیر رو به افزایش است. اسیدهای فنولی به عنوان ترکیبات پاداکسایشی قوی مطرح هستند وعملکرد ضدمیکربی، ضدویروسی، ضدسرطانزایی، ضدالتهابی و اتساع عروق آن‌ها گزارش شده‌است (۴).

Mentha aquatica معروف به اوجی متعلق به خانواده *Labiatae* و جنس *Mentha* است. اوجی سبزی محلی بومی مناطق شمال کشور است که در حاشیه جریان آب‌های ملایم و کم‌عمق یافت می‌شود. برگ‌های این گیاه به عنوان سبزی خوراکی و عامل طعم دهنده مواد غذایی در شمال کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد. جنس *Mentha* در فلور ایران ۶ گونه را به‌خود اختصاص داده‌است. گونه‌های این جنس به طور کلی تحت نام نعنا و پونه در ایران معروف است. گیاهان خانواده نعنا به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنولی توجه اکثر محققان را به‌خود جلب نموده اند. عامل اصلی بروز اثرات پاداکسایشی، ضدمیکربی و خواص دارویی گیاهان خانواده نعنا ناشی از اسانس‌ها و اسیدهای فنولی گزارش شده است (۶، ۵). اثرات ضدمیکربی اسانس‌های نعنا و مریم گلی به اثبات رسیده است (۷). نتایج بررسی فعالیت ضدرادیکالی عصاره متانولی چند سبزی خوراکی (تره، گشنیز، ریحان، شاهی، نعنا و ترخون) حاکی از آن بود که عصاره نعنا با کمترین میزان IC_{50} (The inhibitor concentration at which DPPH radicals were scavenged by 50%) به مقدار۲۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به عصاره سایر سبزی‌های مورد بررسی، بالاترین فعالیت ضدرادیکالی را دارا بود و فعالیتی نزدیک به BHT (butylated hydroxytoluene) نشان داد (۸). همچنین مشخص شده است که میزان کل ترکیبات فنولی ۲۳ نوع ریحان ایرانی بین ۲۲/۹ تا ۶۵/۵ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک بود (۹). محتوای فنول کل و IC_{50} فعالیت ضدرادیکالی عصاره متانولی گونه‌ای از نعنا با نام محلی سرسم (*M. spicata*) به ترتیب ۳۸/۲۷ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پودر خشک و ۴۸۹/۹۷ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۰). عصاره‌های اتانولی و آبی واریته پیپرتیا نعنا (*M. piperita*) فعالیت پاداکسایشی چشمگیری را نشان دادند. اما فعالیت پاداکسایشی عصاره آبی کمتر از عصاره اتانولی گزارش شده است (۱۱). عصاره متانولی نعنا واریته لانگیفولیا (*Mentha longifolia*) فعالیت پاداکسایشی (مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) بسیار بهتری نسبت به اسانس نشان داد. IC_{50} عصاره و اسانس به ترتیب برابر ۵۷/۴ و۱۰۷۰۰ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شده است. اما در مقایسه با BHT به عنوان یک آنتی اکسیدان سنتزی، هم عصاره و هم اسانس فعالیت پاداکسایشی ضعیف تری نشان دادند (۱۲). با توجه به این که، اغلب گزارشات علمی در زمینه ارزیابی پتانسیل اسانس گونه‌های مختلف نعنا بوده است و و از آن جاکه این گیاه از لحاظ بیولوژیکی دارای ترکیبات زیست فعال بالقوه است و پتانسیل گونه‌های بومی این گیاه هنوز ناشناخته مانده، لذا بررسی فعالیت ضدرادیکالی و ضدمیکربی عصاره گونه‌ی نعنا بومی ایران (اوجی) از اهمیت بالایی برخوردار است. در نتیجه این پژوهش اولین گزارش علمی در زمینه سنجش محتوای ترکیبات زیست فعال، توانایی مهار رادیکال‌های آزاد، ارزیابی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

فعالیت ضد میکربی و سنجش اسیدهای فنولی عصاره متانولی استخراج شده به روش اولتراسوند می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

تهیه عصاره: در این پژوهش بخش‌های هوایی (برگ و ساقه) سبزی اوجی در مرحله رویشی از حواشی مناطق جنگلی شهرستان گرگان واقع در استان گلستان جمع‌آوری شد. سبزی‌ها پس از شستشو و خشک کردن در آون با دمای ۰/۵ ±۴۰ درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب صنعتی، به پودر تبدیل و از الک با مش ۴۰ گذرانده شدند. جهت تهیه عصاره فنولی از حلال متانول ۸۰٪ (حجمی: حجمی) استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال با ۱۰ گرم پودر سبزی مخلوط و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد توسط گرمخانه مجهز به شیکر هم‌زده شد. بعد از طی مدت زمان استخراج، عصاره با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و بخش جامد جدا گردید. سپس عمل استخراج با حلال تازه و با استفاده از حمام فراصوت به مدت نیم ساعت تکرار گردید. عصاره‌های حاصل از دو مرحله با یکدیگر ادغام گردیدند و توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در نهایت توسط خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک و به پودر تبدیل شدند. با محاسبه وزن اولیه بالن و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک (پودر فنولی) است و با تقسیم آن بر وزن نمونه، بازده استخراج محاسبه گردید. پودرهای فنولی حاصل تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. عمل عصاره-گیری در سه تکرار انجام شد و میانگین میزان رطوبت سبزی ۸۷/۶۳±۰/۱۰ تعیین شد.

تعیین محتوای کل ترکیبات فنولی: میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد (۱۳). بطور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ میلی-لیترآب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰٪) به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش را بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرارگرفت و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتردر طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. بدین منظور ابتدا محلول پایه‌ای از گالیک اسید آماده و غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه و منحنی استاندارد بر مبنای جذب در برابر غلظت رسم گردید. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش گردید.

تعیین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH: برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پودر فنولی و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرارگرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید (۱۴).

درصد مهار رادیکال آزاد $= (A_c-A_s)/A_c \times 100$

در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

معمولاً برای مقایسه بهتر فعالیت ضدرادیکالی از فاکتوری تحت عنوان IC_{50} استفاده می‌شود. طبق تعریف IC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضدرادیکالی بیشتری دارد.

ارزیابی فعالیت ضد میکربی عصاره: باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی در این مطالعه شامل *باسیلوس سرئوس* (PTCC ۱۱۷۸)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC ۱۱۱۲) و باکتری‌های گرم منفی شامل *اشریشیا کلی* (PTCC ۱۳۳۰)، *سالمونلا انتریکا* (PTCC ۱۶۳۹) بودند. سویه‌های خالص این باکتری‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره با استفاده از روش رقیق‌سازی در مایع (براث میکرودایلوشن) تعیین گردید.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

برای این منظور از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل استفاده شد. محلول پایه عصاره در محیط کشت مولرهینتون براث و دی‌متیل‌سولفوکساید تهیه گردید و غلظت‌های مختلف عصاره (۴۰- ۰/۱۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) با رقیق‌سازی محلول پایه با محیط کشت مولرهینتون براث تهیه گردید. جهت فعال‌سازی سویه‌های باکتری از محیط کشت مولرهینتون براث استفاده شد و کشت تازه باکتری‌ها ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش در محیط کشت نوترینت آگار تهیه شد. سوسپانسیون میکربی (10^6 cfu/ml) معادل رقت ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند تهیه گردید. بعد از پرکردن چاهک‌ها میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس میزان کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اولین خانه‌ای که در آن کدروتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظرگرفته شد. از خانه‌هایی که در آن‌ها هیچ کدروتی مشاهده نشد به میزان ۱۰ میکرولیتر به محیط کشت مولرهینتون آگار منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد و اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین گردید (۱۶، ۱۵).

تعیین اسیدهای فنولی: به منظور تعیین نوع و میزان اسیدهای فنولی موجود در عصاره از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. مشخصات دستگاه به شرح زیر بود:

مدل دستگاه: مرک- هیتاچی ال- ۷۱۰۰؛ دتکتور: دیود اری هیتاچی ال- ۲۴۵۰؛ آون ستون: هیتاچی ال-۲۳۰۰؛ نوع ستون: آر پی- ۱۸ با ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر.

فاز متحرک مورد استفاده در این بررسی شامل آب دیونیزه: متانول: اسید استیک با نسبت ۸۰: ۱۸: ۲ میلی‌لیتر (حجمی: حجمی)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون ۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه، سیستم مورد استفاده ایزوکراتیک و دمای ستون ۲۸ درجه سانتیگراد بود. جهت اندازه‌گیری محتوای گالیک اسید، کافئیک اسید و کلروژنیک اسید نمونه، میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره فنولی استخراجی (تهیه عصاره) بعد از تغلیظ توسط دستگاه تبخیرکننده چرخشی و عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون به ستون دستگاه HPLC تزریق گردید. با مقایسه زمان تاخیر و سطح زیر منحنی نمونه، با نمونه‌های استاندارد در طول موج ۲۸۰ نانومتر، میزان اسیدهای فنولی شناسایی و میزان این ترکیبات با رسم منحنی استانداردها تعیین شد (۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش، تیمارها در سه تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P < ۰/۰۵$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS.9.1 انجام شد.

• یافته‌ها

میزان ترکیبات فنولی و بازدهی استخراج: جدول ۱ میزان کل ترکیبات فنولی و بازده استخراج عصاره متانولی ۸۰٪ سبزی اوجی را نشان می‌دهد. میزان کل ترکیبات فنولی به روش فولین سیوکالتو و بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید ($y = ۰/۰۶۶۹ x + ۰/۰۱۱۶، r^2 = ۰/۹۹۸$) تعیین گردید (شکل ۱). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، عصاره اوجی غنی از ترکیبات فنولی است (۷۹/۵۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) و میزان بازده استخراج نیز قابل ملاحظه بود.

جدول ۱. میزان کل ترکیبات فنولی و بازده استخراج عصاره متانولی اوجی

نمونه	فنول کل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	بازدهی استخراج (٪)
عصاره متانولی	۷۹/۵۳±۱/۳	۲۲/۰۸±۰/۹

فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH: جدول ۲ میزان کاهش جذب محلول DPPH را در حضور غلظت‌های مختلف عصاره سبزی اوجی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که غلظت عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد DPPH دارد ($P <۰/۰۵$). فعالیت ضدرادیکالی در عصاره و نیز در آنتی‌اکسیدان سنتزی وابسته به غلظت بود. به طوری که با دو برابر شدن غلظت از ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، درصد مهارکنندگی عصاره متانولی اوجی ۲/۵ برابر افزایش یافت اما از ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این افزایش فعالیت ضدرادیکالی ۳۰ درصد می‌باشد. در تمامی غلظت‌های مورد بررسی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT فعالیت ضدرادیکالی بالاتری را به خود اختصاص داد. میزان IC_{50}

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

عصاره اوجی و BHT به ترتیب ۸۰/۸۹ و ۳۷/۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. در کل، افزایش غلظت ترکیبات فنولی بطور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. نوع، ماهیت و غلظت ترکیبات پلی‌فنولی موجود در عصاره‌های گیاهی در میزان فعالیت ضدرادیکالی عصاره گیاهی موثر می‌باشند.

جدول ۲. درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره و BHT

غلظت (میکروگرم در میلی‌لیتر)	درصد مهارکنندگی عصاره اوجی	درصد مهارکنندگی BHT
۵۰	۲۶/۴۶±۰/۳۹	۵۵/۶۳±۰/۳۹
۱۰۰	۶۵/۹۶±۰/۴۷	۷۹/۹۸±۰/۳۹
۱۵۰	۷۲/۲۸±۰/۱۹	۸۷/۳۲±۰/۳۹
۲۰۰	۸۷/۲۳±۰/۲۰	۹۱/۲۴±۰/۳۹

فعالیت ضد میکربی عصاره: فعالیت ضدمیکربی عصاره متانولی سبزی اوجی بر تعدادی از باکتری‌های پاتوژن و فسادزای مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دو شکل MIC و MBC در جدول ۳ نشان داه شده است. نتایج نشان داد که عصاره مورد بررسی در غلظت‌های مختلف توانست بر کلیه باکتری‌های مورد بررسی اثرات بازدارندگی و کشندگی داشته باشد. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود غلظت مهارکنندگی رشد و کشندگی برای هر باکتری یکسان بود که این امر بیانگر قوی بودن اثر ضدمیکربی عصاره است. باکتری‌های *سالمونلاانتریکا* و *اشریشیاکلی* به ترتیب بیشترین (۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کمترین (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) حساسیت به عصاره را نشان دادند. نتایج جالب توجه این تحقیق حاکی از تأثیر قوی عصاره بر باکتری سالمونلای گرم منفی و مطرح پاتوژنی مواد غذایی است. همچنین یکسان بودن فعالیت مهارکنندگی و کشندگی عصاره متانولی اوجی بر کلیه باکتری‌های مورد بررسی، حاکی از قوی بودن فعالیت ضدمیکربی این گیاه می‌باشد که این خاصیت ناشی از حضور ترکیبات زیست فعال موثر به ویژه اسیدهای فنولی با خاصیت ضدمیکربی بالا در اوجی است.

جدول ۳. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اوجی

	مشخصات باکتری	MIC* (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	MBC** (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
گرم مثبت	*باسیلوس سرئوس* (PTCC 1178)	۲۰	۲۰
	استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)	۱۰	۱۰
گرم منفی	*اشریشیا کلی* (PTCC 1330)	۴۰	۴۰
	سالمونلا انتریکا (PTCC 1639)	۲/۵	۲/۵

* حداقل غلظت بازدارندگی

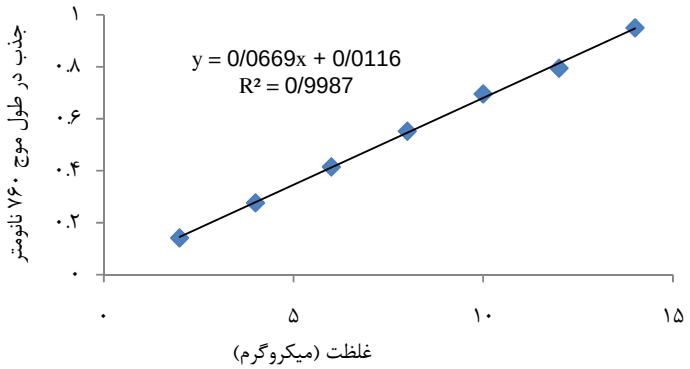
** حداقل غلظت کشندگی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

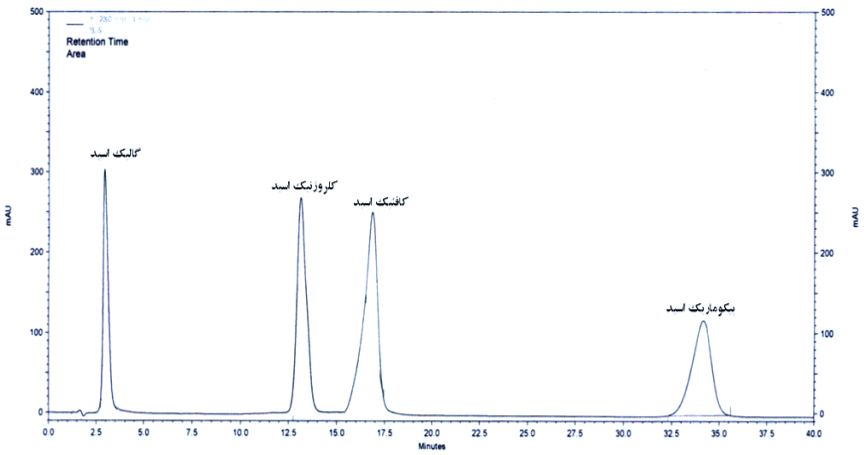
تعیین اسیدهای فنولی عصاره با HPLC: نوع و میزان اسیدهای فنولی موجود در عصاره متانولی برگ‌های اوجی با مقایسه‌ی زمان بازداری پیک‌های نمونه با زمان بازداری پیک‌های مربوط به استانداردهای اسیدهای فنولی تعیین گردید (شکل‌های ۲ و ۱). از بین ترکیبات فنولی مورد بررسی، پاراکوماریک اسید بیشترین زمان بازداری و گالیک اسید کمترین زمان خروج را به خود اختصاص داد. گالیک اسید از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدها بوده و در ساختار خود دارای ۳ گروه هیدروکسیل می‌باشد و به دلیل قطبیت بالا زودتر از سایر ترکیبات از ستون خارج می‌شود. در میان اسیدهای فنولی مورد بررسی، سبزی اوجی فاقد پاراکوماریک اسید می‌باشد و میزان اسیدهای فنولی گالیک، کلروژنیک و کافئیک به ترتیب میکروگرم در گرم بافت خشک برگ‌های اوجی اندازه‌گیری شد (جدول ۴). فراوان‌ترین اسید فنولی موجود در برگ‌های اوجی کلروژنیک می‌باشد.

جدول ۴. میزان اسیدهای فنولی عصاره متانولی اوجی

اسید فنولی	زمان بازداری (دقیقه)	مقدار (میکروگرم بر گرم بافت خشک)
گالیک اسید	۳/۲	۹/۹۴±۱/۴
کلروژنیک اسید	۱۳/۴	۷۳۲/۸۴±۶/۴
کافئیک اسید	۱۶/۹	۱۷۴/۹۶±۸/۶
پاراکوماریک اسید	۳۴/۱	-

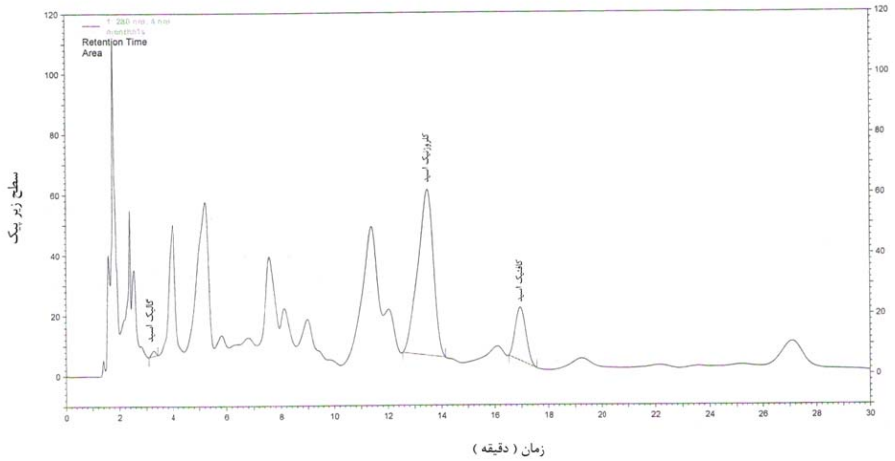


شکل ۱. منحنی استاندارد گالیک اسید



شکل ۲. کروماتوگرام مخلوط استانداردهای اسیدهای فنولی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]



شکل۳. کروماتوگرام اسیدهای فنولی عصاره متانولی اوجی

• بحث

عموماً جهت استخراج فنول‌ها از منابع گیاهی حلال‌های الکلی به صورت مخلوط با آب مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین روش‌های نوین استخراج مانند استفاده از امواج فراصوت به علت تخریب غشای سلول و افزایش نفوذ حلال به داخل، سبب خروج میزان بیشتری از ترکیبات فنولی به محیط حلال می‌شوند. در نتیجه بازده استخراج و میزان کل ترکیبات فنولی عصاره افزایش می‌یابد (۱۹، ۱۸). میزان ترکیبات پلی‌فنولی در عصاره‌ها تعیین کننده فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد است (۲۰). توانایی مهارکنندگی فنول‌ها به دلیل گروه‌های هیدروکسیل (OH) و گروه‌های قابل تعویض متوکسی (OCH_3) در مولکول هاست (۲۱). میزان بازده استخراج و IC_{50} فعالیت پاداکسایشی عصاره متانولی سرسم (*M. spicata*) به ترتیب ۴/۴۲ درصد و ۲۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد (۸). در بررسی دیگری میزان کل ترکیبات فنولی و IC50 فعالیت ضد رادیکالی عصاره بخش‌های هوایی *M. piperita* به ترتیب ۱۳/۴ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پودر عصاره و ۱۲۹/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید (۲۲). این مقادیر نسبت به بازده استخراج، محتوای ترکیبات فنولی و فعالیت ضدرادیکالی عصاره متانولی گیاه اوجی مورد بررسی در این پژوهش کمتر بود. این اختلافات می‌تواند به روش استخراج و ویژگی های ذاتی گیاهان از جمله منشاء و خاستگاه و فصل برداشت ارتباط داشته باشد. علاوه بر تاثیر شرایط محیطی، زمان برداشت، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری، میزان و نیز نوع ترکیبات فنولی در گونه‌های مختلف یک جنس نیز متفاوت است (۲۳). نتایج ارزیابی فعالیت پاداکسایشی عصاره متانولی و اسانس واریته پولگیوم نعنا ایرانی حاکی از آن بود که با افزایش غلظت عصاره فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH افزایش یافته و این فعالیت نسبت به اسانس بیشتر بود (۵). نتایج مطالعات محققان نشان می‌دهد عصاره متانولی سایر گیاهان مانند رزماری (*M. longifolia*) علیرغم داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، از خاصیت ضدمیکربی پایین برخوردارند (۲۴، ۱۲) در حالی که نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره اوجی از فعالیت ضدمیکربی بالایی برخوردار بود که این اثر را می‌توان ناشی از حضور میزان بالای ترکیبات فنولی بویژه اسیدهای فنولی در گیاه دانست.

باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان، دارای یک غشای خارجی در دیواره سلولی خود می‌باشند. سطح هیدروفیلی این غشا که غنی از مولکول‌های لیپوپلی-ساکاریدی است، به عنوان مانع در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌کند. همچنین آنزیم‌های موجود در فضای پری‌پلاسمایی، می‌توانند مولکول‌های ورودی از بیرون را بشکنند اما در مورد باکتری‌های گرم مثبت، مواد ضدمیکربی به راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می‌شوند. اگرچه مطالعات زیادی در شرایط آزمایشگاهی جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکربی عصاره گیاهی صورت گرفته است، اما جزئیات دقیق مکانیسم عمل این ترکیبات مشخص نشده است. بطورکلی ترکیبات پلی‌فنولی فعالیت پاداکسایشی خود را از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

طریق واکنش با پروتئین‌ها، لیپیدها و آنزیم‌های میکربی اعمال می‌نمایند که در نتیجه نفوذپذیری سلول را تغییر می‌دهند و سبب نشت مواد درون سلولی و در نهایت مرگ سلولی می‌گردند. از این رو پلی‌فنول‌هابه دلیل خاصیت ضد میکربی، علیه فساد مواد غذایی و بیماری‌های عفونی مفید می‌باشند (۲۵).

نتایج به دست آمده در آنالیز ترکیبات فنولی عصاره، نتایج حاصل از آزمون‌های ارزیابی فعالیت ضدرادیکالی و ضدمیکربی را تأیید می‌نماید. قدرت پاداکسایشی بالای عصاره‌ی متانولی سبزی اوجی را می‌توان با حضور ترکیباتی نظیر گالیک اسید، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید مرتبط دانست.

در کل می‌توان از عصاره متانولی برگ گیاه اوجی برای جایگزین نمودن مواد شیمیایی جهت کنترل رشد میکربی و افزایش عمر نگهداری مواد غذایی استفاده کرد.

• References

1. Negi P.S. Review plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol 2012; 156: 7-17.
2. Weerakkody SN, Caffin N, Turner SM, Dykes AG. *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control 2010; 21: 1408-1414.
3. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. J dentistry 2009; 37:413-423.
4. Mattila P, Hellström J. Phenolic acids in potatoes, vegetabl es, and some of their products. J Food Compos Anal 2007; 20: 152-160.
5. Kamkar A, Jebelli Javan A, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. Food Chemical Toxicol 2010; 48: 1796-1800.
6. Sajadi S.E, Naderi G, Ziaee R. Antioxidant effects of selected medicinal plants of of *Labiatae* family. J Kermanshah Uni Medic sci 2004; 8(2): 1-12 [in Persian].
7. Izdi Z, Ahmadvand G, Esna-Ashori M, Piri K, Davoodi P. Biochemical and antimicrobial activities of *Salvia officinalis* L. and *Mentha piperita* L. essential oils. J Danesh Armaghan 2010; 15(1): 18-29 [in Persian].
8. Goli MG, Mehraban SM. Comparison of antioxidant and antiradical properties of edible leaf vegetables methanolic extract. J Medic plant 2008; 29: 64-71 [in Persian].
9. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food Chem 2003; 83: 547 – 50.
10. Jamshidi M, Ahmadi H.R.A, Rezazade S, Fathiazad F, Mazandarani M, Khaki A. Evaluation of phenolic compounds and antioxidant activity of some plant speices of native of Mazandaran. J Medic plant 2010; 34: 177-183 [in Persian].
11. Singh R, Shushni M.A.M, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian J Chem 2011; doi:10.1016/j.arabjc. 2011.01.019.
12. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. Food Chem 2007; 103:1449–1456.
13. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. Am J Enol Viticult 1977; 28: 49-55.
14. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agr Food Chem 1992; 40: 945-948.
15. NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M 100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2001; Wayne, PA, USA.
16. Skočibušić M, Bezić N, Dunkić V. Phytochemical composit ion and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata*Vis. growing in Croatia. Food Chem 2006; 96: 20-28.
17. Pande G, C. Akoh C. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. Food Chem 2010; 120: 1067-1075.
18. Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Soumaya B, et al. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. LWT- Food Sci Technol 2010; 43, 632- 639.
19. Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. J Chromatography A 2011; 1218: 2505–2512.
20. Huang D, Ou B, Priop R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Agr Food Chem 2005; 53: 1841-56.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

21.Arabshahi S.D, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chem 2007; 102: 1233-40.

22. Ebrahimzadeh M.A, Nabavi S.F, Nabavi S.M, Eslami B. Antioxidant and antihemolytic activities of *M. piperit*a. Pharmacologyonline 2010; 1: 744-52.

23. Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruit. Analyst 2000; 125; 989–1009.

24. Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chem 2007; 100; 553–559.

25. Wang Y, Lu Z, Wu H, Lv F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against food borne pathogens. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against food borne pathogens. Int J Food Microbiol 2009; 136: 71-74.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]

Phenolic acid content, antiradical and antimicrobial properties of *Mentha aquatica* leaf methanolic extract

Salmanian Sh[1], Sadeghi Mahoonak AR[2], Khomeiri M[3], Masteri Farahani MR[4]*

1- M.Sc in Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran

*2- *Corresponding Author:Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology,Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sadeghiaz@yahoo.com*

3- Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology,Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Assistant Prof, Dept. of Wood Technology & Engineering, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran

Received 21 Jan, 2013 **Accepted 15 May, 2013**

Background and objective: *Mentha aquatica* is an important species of the family *Labiatae* that is commonly grown in the north of Iran. This study evaluated the *in vitro* potential of antioxidant and antimicrobial activity and analyzed the constituent phenolic acid in the methanolic extract of *M. aquatica* leaves as a traditional medicinal plant.

Materials and methods: The total phenolic content of the methanolic extract of *M. aquatica* was determined using the Folin-Ciocalteu method and antimicrobial activity by broth microdilution and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). High-performance liquid chromatography was used to determine the phenolic acid content of the extract. A DPPH radical scavenging assay was used to characterize antioxidant activity.

Results: The methanolic extract of *M. aquati*ca showed excellent antioxidant activity at all concentrations (50, 100, 150, 200 µg/ml). The DPPH activity of the extract increased in a dose dependent manner for a range of 26.46–87.23%. The extract also revealed good antimicrobial activity against the four tested bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*). The most efficient bactericidal activity of the extract was against *Salmonella enteric* at MBC=2.5 mg/ml and *Escherichia coli* was the strongest bacterium (MBC = 40 mg/ml). Analysis of the phenolic acid content in the leaves showed that chlorogenic acid (732.84 µg/g dw) was a predominant compound.

Conclusion: The methanolic extract of the *M. aquatica* leaves can be used in place of chemical substances to control bacterial growth and increase the shelf- life of food.

Keywords: Chlorogenic acid, Antibacterial activity, Antiradical activity, *Mentha aquatica*, Phenolic compounds

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-31]