

مقایسه ترکیب‌های فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی هفت گونه پونه‌سا کشت شده در مشهد^۱

Comparison of Phytochemical Compositions and Antioxidant Activity of Seven *Nepeta* species Cultivated in Mashhad

فاطمه زهرا امیرمحمدی، مجید عزیزی^{*}، سید حسین نعمتی^۲

چکیده

در پژوهش حاضر ترکیب‌های فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی هفت گونه پونه‌سا شامل *Nepeta teucriifolia* subsp. *N. kotschyi* و *N. racemosa* var. *crassifolia*، *N. binaloudensis*، *N. cataria*، *N. glomerulosa*، *N. assurgens* و *teucriifolia* کشت شده در هوای آزاد بررسی شد. این پژوهش در باغ پژوهشی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار صورت گرفت. محتوای ایریدوئید کل، فلاونوئید، فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. تجزیه اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS انجام شد. نتیجه‌ها نشان داد در بین گونه‌های بررسی شده، میزان فنول کل از دامنه ۱۸۶/۴۷ تا ۴۶۴/۲۵ (میلی گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک) متغیر بود. گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* با مقدار ۱۴۲/۲۰ و گونه *N. glomerulosa* با مقدار ۴۳/۰۸ (میلی گرم معادل کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه) به ترتیب بیشترین و کمترین محتوای ترکیب‌های فلاونوئیدی را داشتند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC₅₀) در گونه‌های بررسی شده از دامنه ۱۱۷ تا ۲۸۷/۳۳ (میکروگرم در هر میلی‌لیتر عصاره) در روش DPPH و ۶۶/۶۷ تا ۸۱/۰۹ (میلی‌مول آهن) در روش FRAP به دست آمد. بیشترین و کمترین درصد اسانس ۰/۷۴ و ۰/۰۶ درصد حجمی-وزنی به ترتیب از گونه‌های *N. assurgens* و *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* به دست آمد. براساس نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش و براساس ترکیب‌های اصلی شناسایی شده در اسانس، گونه‌های مورد بررسی در سه گروه: گونه‌های دارای ترکیب‌های غالب هومولن و کاریوفیلن (*N. glomerulosa*، *N. teucriifolia* subsp. *Teucriifolia*)، گونه‌های دارای ترکیب غالب، ۸،۱- سینئول و ایزومرهای نپتالاکتون (*N. assurgens*، *N. binaloudensis* Jamzad) و گروه آخر شامل *N. N. racemosa* var. *crassifolia*، *N. cataria*، *kotschyi*، دارای ترکیب اصلی نپتالاکتون، تقسیم‌بندی شد.

واژه‌های کلیدی: *Nepeta*، نپتالاکتون، FRAP، DPPH، فنول، فلاونوئید.

مقدمه

در سال‌های پیشین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به علت اثرهای مضر آن‌ها محدود شده است و تمایل جهانی به سمت استفاده از ترکیب‌های فیتوشیمیایی موجود در منابع طبیعی مانند گیاهان، میوه‌ها و دانه‌های روغنی می‌باشد. اثرهای این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های گوناگون مشخص شده است (۱۱). ترکیب‌های فنولیک گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که به‌طور گسترده در گیاهان توزیع شده‌اند. در تیره نعنائیان^۳ بیش از ۲۰۰ جنس از گیاهان اسانس‌دار وجود دارد. جنس "پونه‌سا" یا *Nepeta* یکی از بزرگ‌ترین جنس‌ها در این تیره است. این جنس شامل حدود ۳۰۰ گونه گیاهی چندساله و به ندرت یک‌ساله است. بزرگ‌ترین تنوع و غنای گونه‌ای بین جنس‌ها در دو منطقه جنوب غربی آسیا

تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۲۸

۱- تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۸

۲- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (azizi@um.ac.ir).

(به‌ویژه ترکیه و ایران) و هندوکش یافت می‌شود. ایران با دارا بودن ۷۹ گونه، یکی از مناطق اصلی منشأ این جنس می‌باشد (۳). بیشتر گونه‌ها به صورت خودرو در نقاط مختلف کشور رویش دارند. گزارش‌های پیشین در مورد ترکیب‌های اسانس گونه‌های مختلف پونه‌ها نشان می‌دهد که بعضی از گونه‌های این جنس دارای مقادیر بالایی از ترکیب‌های نپتالاکتون و مشتقات آن می‌باشند. نپتالاکتون‌ها (جزء شاخص اسانس)، ایریدوئیدها و گلیکوزیدهای آن‌ها، دی‌ترین‌ها، تری‌ترین‌ها و فلاونوئیدها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه اصلی گونه‌های مختلف این جنس شناخته شده‌اند (۱۵). نپتالاکتون‌ها، مونوترپنوئیدهای دو حلقه‌ای می‌باشند که از ترکیب دو حلقه‌ای سیکلوپنتان و لاکتون تشکیل شده‌اند. این ترکیب‌ها دارای فعالیت‌های زیستی متعددی از جمله، فعالیت ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد ویروسی، تأثیر بر سیستم عصبی، ضددرد، ضد تصلب شرایین، آرام‌بخشی اعصاب، فعالیت سیتوتوکسیک و فیتوتوکسیک، اثرهای رفتاری و جذب‌کنندگی روی گربه‌سانان و فعالیت دورکنندگی حشرات می‌باشند (۱۵). میزان اسانس، تعداد و درصد ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس افزون بر ژنتیک گیاه زیر تأثیر عوامل مختلفی از جمله شرایط محیطی، زمان برداشت، تغذیه، آبیاری، اقلیم و مرحله رشدی گیاه قرار می‌گیرد (۳۵). کاشت جمعیت‌های مختلف در شرایط محیطی یکسان، اثرهای محیطی را در بروز ویژگی‌های رویشی، نوع و میزان ماده‌های مؤثره کاهش داده و تنوع حاصل از اختلاف‌های ژنتیکی اکوتیپ‌ها را بهتر نمایان می‌سازد (۵). به دلیل تنوع گونه‌های مختلف گیاهان دارویی در کشورمان فرصت‌های فراوانی برای سرمایه‌گذاری روی تولید این محصول‌ها وجود دارد. براساس آمار و اطلاعات منتشرشده توسط وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۵ سطح زیر کشت گیاهان دارویی کشور حدود ۴۳ هزار هکتار بوده، که از این میزان سطح زیر کشت حدود ۱۵۰ هزار تن گیاهان دارویی حاصل شده است. حدود ۷۳٪ سطح زیر کشت گیاهان دارویی در چهار استان خراسان رضوی، خراسان جنوبی، کرمان و همدان متمرکز شده است (۱). با توجه به پتانسیل مناسب در راستای تولید گیاهان دارویی در کشور، تلاش در جهت شناسایی، حفظ و حراست، افزایش کشت و اهلی کردن گونه‌های گیاهی، به‌عنوان گامی مؤثر در جهت حفظ و بقای گونه‌ها ضرورت دارد. بنابراین لازم است تا پژوهش‌های همه جانبه‌ای برای شناسایی تفاوت‌های فیتوشیمیایی گیاهان دارویی انجام و نسبت به اهلی‌سازی و معرفی گونه‌های یادشده به سیستم‌های کشاورزی اقدام شود. در بررسی حاضر برای اولین بار در مشهد، محتوای فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، درصد و اجزای اسانس چند گونه "پونه‌سا" با کشت در شرایط یکسان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط اقلیمی و خاک محل انجام آزمایش

این آزمایش در سال زراعی ۹۷-۱۳۹۶ در باغ پژوهشی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. نمونه‌برداری خاک محل کشت از عمق ۳۰ سانتی‌متری انجام شد. ویژگی‌های جغرافیایی (داده‌های اداره هواشناسی استان خراسان رضوی) و اطلاعات مربوط به واکاوی خاک در جدول ۱ آورده شده است.

ماده‌های گیاهی

بذر گونه‌های مورد بررسی (هفت گونه چند ساله) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان و هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. اطلاعات گونه‌های بررسی شده در جدول ۲ آورده شده است.

مراحل کاشت تا برداشت

بذرها در گلخانه با میانگین دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰٪ در سینی‌های کشت حاوی پیت‌ماس، کوکوپیت و پرلایت (۴۰:۴۰:۲۰) به‌صورت سطحی کشت شدند. به‌منظور جلوگیری از تنش آبی، تا زمان سبز شدن، رطوبت بستر حفظ شد (با استفاده از گونی کنفی مرطوب). پس از رسیدن دانه‌ها به اندازه مناسب (مرحله شش الی هشت برگه) آن‌ها به گلدان بزرگ‌تر دارای همان ترکیب بستر کشت انتقال داده شدند. دانه‌ها در اردیبهشت ماه به زمین اصلی در کرت‌هایی به ابعاد یک مترمربع و فاصله کشت ۲۵ سانتی‌متر منتقل شدند. برداشت پیکر رویشی در مرحله گلدهی کامل در اواخر تابستان (شهریور تا اوایل مهر) صورت گرفت (تصویرهای کلی مربوط به کشت گونه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است).

جدول ۱- ویژگی‌های محل کشت گونه‌های پونه‌سای مورد بررسی.

Table 1. Characteristics of the field of the studied *Nepeta* species.

ویژگی‌های خاک Soil characteristics	درصد رس Clay (%)	درصد سیلت Silt (%)	درصد شن Sand (%)	بافت خاک Soil texture	ظرفیت زراعی FC (%)	درصد کربنات کلسیم CCE (%)	pH	شوری EC (dSm ⁻¹)	درصد ماده‌های آلی Organic matter (%)
داده Data	26	48	26	لومی- شنی Sandy loam	15	12.5	7.28	3.70	0.78
ویژگی‌های خاک Soil characteristics	نیترژن قابل دسترس Available N (ppm)	فسفر قابل دسترس Available P (ppm)	پتاسیم قابل دسترس Available K (ppm)	درصد کلسیم Ca (%)	منیزیم قابل دسترس Available Mg (ppm)	مس قابل دسترس Available Cu (ppm)	منگنز قابل دسترس Available Mn (ppm)	روی قابل دسترس Available Zn (ppm)	آهن قابل دسترس Available Fe (ppm)
داده Data	16.2	14.7	278	0.08	11	1.27	7.92	1.93	1.51
ویژگی‌های هواشناسی Meteorological characters	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)	کمینه دمای سالانه Annual minimum temperature (C)	بیشینه دمای سالانه Annual maximum temperature (C)	میانگین دمای سالانه Annual mean temperature (C)	میانگین رطوبت مطلق سالانه Mean of annual absolute humidity (%)	بارندگی سالانه Annual precipitations (mm)	تعداد روزهای یخبندان Number of frost days	تعداد روزهای بارانی Number of rainy days	
داده Data	985	9.1	22.4	15.7	46	308.1	17	97	

جدول ۲- اطلاعات مربوط به ۷ گونه پونه‌سای مطالعه شده در این پژوهش به همراه محل جمع‌آوری آن‌ها.

Table 2. Information of seven *Nepeta* species studied in this research along with their collecting location.

گونه Species	محل جمع‌آوری و رویشگاه Collecting site and habitat	ارتفاع Altitude (m)	تاریخ جمع‌آوری Collection date	شماره هرباریومی Herbarium voucher No.
<i>N. assurgens</i> Hausskn. & Bornm. ex Bornm. †	Kerman province, Darb-e-Behesht	3323	20.09.2017	8636 ANRRCIH
<i>N. kotschy</i> Boiss. var. <i>persica</i> (Boiss.) Jamzad†	Kerman province, 47 km after Darb-e-Behesht	2350	28.09.2017	7838 ANRRCIH
<i>N. teucriifolia</i> Willd. subsp. <i>teucriifolia</i> ¹	Kerman province, Rayen, Hezar mountain	3831	29.09.2016	24580 FUMH
<i>N. glomerulosa</i> Boiss. subsp. <i>glomerulosa</i>	Kerman province, Bardsir, Ghalehaskar	2749	26.09.2015	23503 FUMH
<i>N. binaloudensis</i> Jamzad†	Khorassan Razavi province, Zoshk, Binalud mountains	2400	29.09.2015	46489 FUMH
<i>N. racemosa</i> Lam. var. <i>crassifolia</i> (Boiss. & Buhse) A.L. Budantzev† ²	Tehran province	1250	12.09.2016	2703 FUMH
<i>N. cataria</i> L.	Khorassan Razavi province, Mashhad	1010	20.08.2017	44565 FUMH

††Endemic of Iran, 1- This name is a synonym of *N. fissa*, 2- This name is a synonym of *N. crassifolia*

بومی ایران، ۱- گونه *N. fissa* تغییر نام یافته، ۲- گونه *N. crassifolia* تغییر نام یافته.



Fig.1. Cultivated species in the field at flowering stage. 1: *N. racemosa* var. *crassifolia*, 2: *N. cataria*, 3: *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia*, 4: *N. kotschy*, 5: *N. assurgens*, 6: *N. glomerulosa*, 7: *N. binaloudensis*.

شکل ۱- گونه‌های کشت‌شده در زمین در مرحله گلدهی ۱: *N. racemosa* var. *crassifolia*، ۲: *N. cataria*، ۳: *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia*، ۴: *N. kotschy*، ۵: *N. assurgens*، ۶: *N. glomerulosa*، ۷: *N. binaloudensis*

ماده‌ها و تجهیزات آزمایشگاهی

ماده‌های شیمیایی، استانداردها و معرف‌های مورد استفاده از شرکت Merck تهیه شد و در انجام تمامی آزمایش‌ها از آب مقطر استفاده گردید. برای خواندن جذب نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Cecile UV/VIS) استفاده شد.

استخراج عصاره‌ها

آماده‌سازی عصاره از نمونه خشک‌شده در شرایط سایه و دمای محیط بر اساس روش‌های گفته شده در منابع با اندکی تغییرها انجام شد (۴، ۳۵). به‌منظور استخراج عصاره از حلال متانول (درجه خلوص ۹۶٪) استفاده شد. بدین منظور مقدار یک گرم از نمونه خشک شده، پودر شد و سپس در ۱۰ میلی‌لیتر از حلال به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. عصاره با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. این عصاره برای انجام آزمایش‌های بعدی در شیشه‌های تیره و در یخچال نگهداری شد.

ترکیب‌های ایریدوئید کل

محتوای ایریدوئید بر اساس روش کالریمتری بر مبنای واکنش تریم و هیل اندازه‌گیری شد. در این روش مقدار ۴۰۰ میلی‌لیتر عصاره با چهار میلی‌لیتر معرف تریم و هیل^۱ شامل (استیک اسید/سولفات مس/ کلریدریک اسید به‌ترتیب با نسبت ۵:۱۰:۱۰) مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر، در طول موج ۶۰۹ نانومتر خوانده شد (۳۶).

تعیین مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی

میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی از روش‌های آورده شده در منابع با اندکی تغییرها (۲۹) تعیین شد. بدین صورت که به ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره، یک میلی‌لیتر متانول خالص افزوده، سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید (۱۰٪) و ۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار افزوده و در نهایت مقدار یک میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و جذب نمونه‌ها پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر بلانک (همه ماده‌ها به‌جز عصاره) خوانده شد. محتوای فلاونوئید عصاره (معادل میکروگرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه) محاسبه شد (۲۹). نمودار استاندارد فلاونوئید در شکل ۲ آورده شده است.

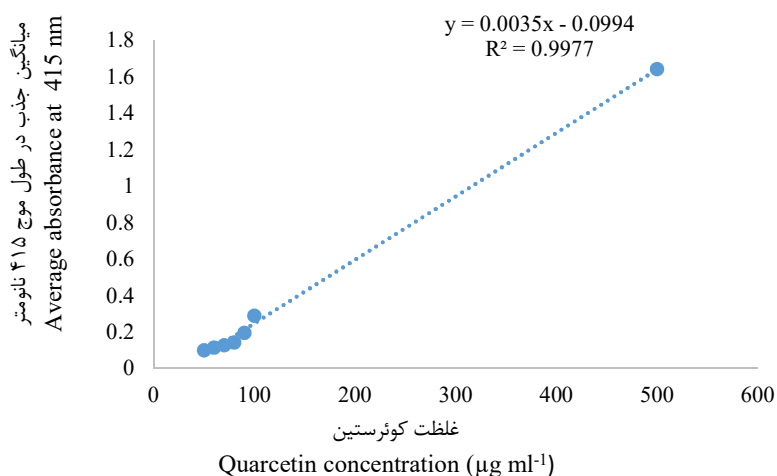


Fig. 2. Flavonoid standard (quarceetin) curve.

شکل ۲- منحنی استاندارد فلاونوئید (کوئرستین).

تعیین مقدار فنول کل^۲

اندازه‌گیری فنول کل بر مبنای روش‌های آورده شده در منابع با اندکی تغییرها انجام شد (۳۴). برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل، ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر عصاره در لوله‌های آزمایش ریخته، سپس مقدار ۴۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو یک نرمال افزوده، پس از پنج دقیقه مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بیکربنات سدیم (۱۰٪) افزوده شد، سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده گردید و در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۹۰ دقیقه نگهداری شد. جذب نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از

دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار فنول کل بر حسب معادل میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه محاسبه شد. نمودار استاندارد فنول در شکل ۳ آورده شده است.

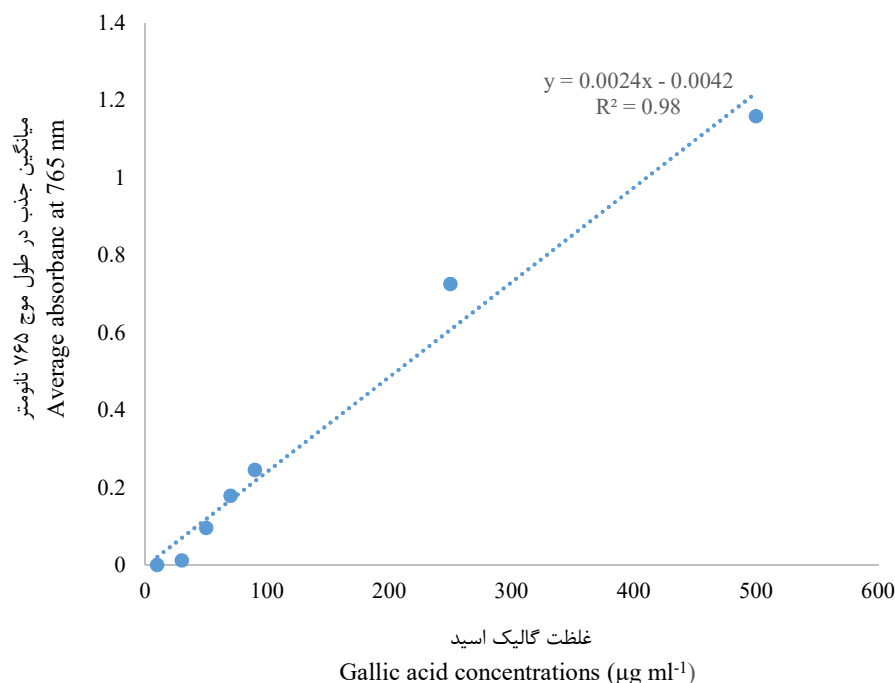


Fig. 3. Total phenolic standard (gallic acid) curve.

شکل ۳- منحنی استاندارد فنول کل (گالیک اسید).

تعیین میزان آنتی اکسیدان به روش احیای آهن (FRAP)

مقدار ۳۰۰ میکرولیتر محلول ذخیره FRAP با ۱۰ میکرولیتر عصاره مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از ۲۰ دقیقه، جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. محلول پایه FRAP با نسبت (۱۰:۱:۱) شامل بافر استات (۳۰۰ میلی مولار با pH ۳/۶) TPTZ: (۱۰ میلی مولار): کلراید آهن (۲۰ میلی مولار) به صورت روزانه تهیه شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف سولفات آهن رسم شد (۱۰).

تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH[•]

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی به ۲ میلی لیتر محلول متانولی DPPH با غلظت ۰/۰۰۴٪ افزوده شد و میزان جذب نور پس از گذشت ۳۰ دقیقه در تاریکی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر بلانک خوانده شد. درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH از رابطه ۱ محاسبه شد (۲۳).

$$\text{درصد مهار رادیکال های آزاد} = \frac{(A_{517} \text{ Blank} - A_{517} \text{ Sample})}{A_{517} \text{ Blank}} \times 100 \quad (1)$$

در رابطه بالا $A_{517} \text{ Sample}$ و $A_{517} \text{ Blank}$ به ترتیب جذب محلول کنترل منفی (همه ماده‌ها به جز عصاره) و جذب آمیخته واکنش در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از به دست آوردن ظرفیت مهار رادیکال آزاد، به منظور مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها از شاخص IC_{50} استفاده شد. شاخص IC_{50} غلظتی از عصاره است که ۵۰٪ رادیکال های آزاد را از بین می برد. غلظت بازدارندگی در ۵۰٪ (IC_{50}) با استفاده از روش رگرسیون غیرخطی محاسبه

شد. با استفاده از نرم‌افزار Prism منحنی dose response با استفاده از نقاط درصد بازدارندگی و غلظت‌های مختلف محاسبه شد (۳۷،۱۲). در نهایت میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس میکروگرم در هر میلی لیتر عصاره بیان گردید.

استخراج و آنالیز اسانس

پیکر رویشی در مرحله گلدهی کامل جمع‌آوری و نمونه‌های گیاهی در سایه خشک شدند. استخراج اسانس از ۵۰ گرم ماده خشک گیاهی با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب به مدت ۳/۵ ساعت انجام شد. میانگین بازده اسانس به صورت درصد حجمی/ وزنی محاسبه شد. رطوبت‌گیری اسانس با سولفات سدیم بدون آب انجام شد. نمونه‌های اسانس تا زمان تجزیه در محیط تاریک و دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) از نوع Agilent technologie و مدل 5975C، ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۱۰ درجه سلسیوس با افزایش دمای سه درجه سلسیوس در دقیقه انجام شد. سپس از دمای ۲۱۰ تا ۲۴۰ درجه سلسیوس با افزایش دمای ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه و تاخیر به مدت ۸/۵ دقیقه در دمای نهایی تنظیم شد. دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. گاز حامل هلیوم و با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ۵۰ تا ۴۸۰ بود. اسانس با دی‌کلرومتان رقیق شد و به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) تزریق شد. شناسایی ترکیب‌های موجود در اسانس با تزریق هیدروکربن‌های نرمال (C9-C25)، با استفاده از شاخص بازدار (RI) و مقایسه طیف‌های جرمی با ترکیب‌های استاندارد در منابع معتبر (Adams) و استفاده از اطلاعات موجود در حافظه کامپیوتر دستگاه GC-MS انجام شد. درصد نسبی ترکیب‌ها با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام محاسبه شد (۷).

واکاوی آماری داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD ($P \leq 0.05$) انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد.

نتایج

نتیجه‌های تجزیه واریانس نشان داد که گونه‌های مورد بررسی از نظر محتوای فنول کل و فلاونوئید و ایریدوئید در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری داشتند. نتیجه‌های آنالیز واریانس فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های بررسی شده با دو روش متفاوت وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ برای گونه‌های بررسی شده را نشان داد. نتیجه‌های تجزیه واریانس گونه‌های بررسی شده حاکی از آن است که گونه‌های مورد بررسی از نظر درصد اسانس در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری داشتند. نتیجه‌های مقایسه میانگین ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در گونه‌های بررسی شده در جدول ۳ نشان داده شده است.

محتوای ایریدوئید، فلاونوئید و فنول کل

از نظر میزان ایریدوئید بیشترین میزان عدد جذب مربوط به ایریدوئید کل، در گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* (0/659) وجود داشت. در بین دیگر گونه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. از لحاظ محتوای فلاونوئید در بین گونه‌های بررسی شده، گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* و گونه *N. binaloudensis* Jamzad به ترتیب با مقادیر ۱۰۴/۵۳ و ۱۴۲/۲۰ (میلی گرم معادل کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه) به ترتیب بیشترین محتوای ترکیب‌های فلاونوئیدی را داشتند. گونه *N. glomerulosa* با مقدار ۴۳/۰۸ کمترین مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی را به خود اختصاص داد. گونه‌های *N. cataria*، *N. racemosa* var. *crassifolia* و *N. kotschy* سطح متوسط از ترکیب‌های فلاونوئیدی را نشان دادند. در بین گونه‌های بررسی شده بیشترین محتوای فنول کل به گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* و گونه *N. binaloudensis* اختصاص یافت. گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* با میانگین ۴۶۴/۲۵ و گونه‌های *N. binaloudensis* و *N. kotschy* نیز به ترتیب با مقادیر ۴۴۴/۳۸ و ۴۰۴/۵۲ (میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه) بیشترین محتوای فنولی را داشتند. گونه‌های *N. cataria*، *N. racemosa* var. *crassifolia* و *N. assurgens* نیز به ترتیب با مقادیر ۲۵۰/۶۳، ۲۸۳/۱۳ و ۳۷۸ دارای محتوای

فنولی در سطح متوسط و گونه *N. glomerulosa* با مقدار ۱۸۶/۴۷ (میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه) دارای کمترین مقدار ترکیب‌های فنولی بود.

جدول ۳- مقایسه میانگین ویژگی‌های ارزیابی شده در گونه‌های پونه‌سای مورد مطالعه.

Table 3. Mean comparison of evaluated characteristics in studied *Nepeta* species.

ویژگی‌های اندازه‌گیری شده Measured characteristics	<i>Nepeta</i> species †						
	N. t	N. b	N. r	N. g	N. c	N. a	N. k
ایریدوئید کل (جذب) Total iridoid (Absorbance)	0.66 ^a	0.25 ^b	0.35 ^b	0.36 ^b	0.29 ^b	0.31 ^a	0.26 ^b
محتوای فلاونوئید Flavonoids content (mg Quercetin in 100 g ⁻¹ of DW)	142.21 ^a	104.54 ^b	68.19 ^d	43.18 ^e	100.51 ^b	80.47 ^{cd}	94.22 ^{bc}
فنول کل Total phenol (mg GAE in 100 g ⁻¹ of DW)	464.25 ^a	444.39 ^{ab}	283.38 ^d	186.43 ^e	250.69 ^d	378 ^c	04.53 ^{bc}
FRAP (mM Fe(II) g ⁻¹)	81.10 ^a	78.73 ^{bc}	71.59 ^{bc}	68.57 ^c	66.69 ^c	77.04 ^{ab}	76.72 ^{ab}
DPPH assay (IC ₅₀ µg ml ⁻¹)	117.33 ^d	130 ^d	269.2 ^a	201.23 ^c	287.33 ^a	192.84 ^c	237.3 ^b
درصد اسانس (حجمی/وزنی) Essential oil (%) (v/w)	0.06 ^d	0.18 ^{cd}	0.48 ^b	0.20 ^{cd}	0.29 ^c	0.74 ^a	0.24 ^c

Values are means of triplicate assays. Means with different letters in the same rows are significantly different at $P \leq 0.05$ on the basis of LSD. † *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* (N. t), *N. binaloudensis* Jamzad (N. b), *N. racemosa* var. *crassifolia* (N. r), *N. glomerulosa* (N. g), *N. cataria* (N. c), *N. assurgens* (N. a), *N. kotschyi* (N. k).
مقدارهای جدول، میانگین‌های حاصل از ۳ سری ارزیابی می‌باشند. میانگین‌های دارای حرف‌های متفاوت در هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتیجه‌های آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH بر پایه IC₅₀ بیان شد. شاخص IC₅₀ بیانگر غلظت مؤثری از نمونه‌هاست که ظرفیت مهار ۵۰٪ رادیکال DPPH را دارند. هر چه مقدار IC₅₀ کمتر باشد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد (بازداری بیشتر عصاره) و عکس آن نیز وجود دارد. نتیجه‌های FRAP بر پایه میلی‌مول آهن در وزن خشک گزارش شد. خلاف نتیجه‌های IC₅₀ مربوط به DPPH، مقادیر بالاتر به‌دست‌آمده با روش FRAP، نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر گونه‌ها بر اساس این روش می‌باشد. در گونه‌های بررسی شده در پژوهش حاضر مقدار IC₅₀ مربوط به تست DPPH از دامنه ۱۱۷ برای گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* تا ۲۸۷/۳۳ برای گونه *N. cataria* متغیر بود. در نتیجه‌های تست FRAP نیز گونه‌های *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia*، *N. binaloudensis*، *N. kotschyi*، *N. assurgens* و *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در این روش نشان دادند. در تست DPPH نیز نتیجه‌ها مشابهی به دست آمد. گونه‌های *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia*، *N. binaloudensis* و *N. assurgens* بیشترین فعالیت را در روش DPPH نشان دادند. با توجه به نتیجه‌های به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد هر دو آزمون، نتیجه‌های به‌تقریب یکسانی برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مورد بررسی نشان دادند.

همبستگی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با محتوای فلاونوئیدی و فنولی

نتیجه‌ها حاکی از وجود همبستگی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های فنولی می‌باشد (شکل ۴). در روش DPPH یک ارتباط خطی و منفی بین محتوای فنول کل و IC₅₀ DPPH مشاهده شد ($R^2 = 0.4477$) (شکل ۴-الف). بین محتوای فلاونوئید و IC₅₀ DPPH نیز همبستگی ($R^2 = 0.2249$) وجود داشت، اما همبستگی بین محتوای فنولی، قوی‌تر از محتوای فلاونوئید بود. بین FRAP و محتوای فنول، همبستگی مثبت و قوی‌تری از محتوای فنول کل و IC₅₀ DPPH مشاهده شد ($R^2 = 0.6991$)، (شکل ۴-ب).

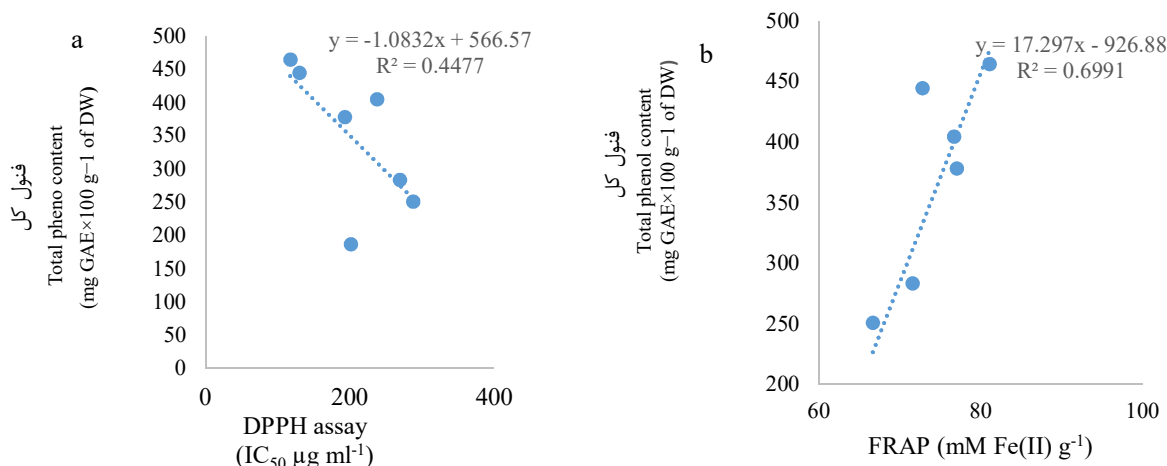


Fig. 4. Correlation of (a) TP and DPPH free radical scavenging activity (IC₅₀DPPH g, DPPH/mL), (b) TP and FRAP (mmol Fe²⁺ g⁻¹ dry plant material).

شکل ۴- (a) همبستگی بین فنول کل و DPPH، (b) همبستگی بین FRAP و فنول کل.

میزان و اجزای اسانس

درصد اسانس و اجزای اصلی اسانس در هفت گونه پونه‌سای کشت‌شده در شرایط محیطی و زراعی یکسان بررسی شد. بسیاری از گونه‌های این جنس به‌علت سازگاری با مناطق خشک و مقدار بالای اسانس و ترکیب‌های فنولیک از دیدگاه باغبانی دارای ارزش دارویی می‌باشند. تعداد، ترکیب‌های شناسایی شده اسانس و مجموع ترکیب‌ها به همراه شاخص بازدارندگی اسانس و درصد اسانس در گونه‌های مورد بررسی در جدول ۴ نشان داده شده است. داده‌های حاصل از ارزیابی گوناگونی اسانس در گونه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر در سال دوم کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های حاصل نشان داد بین گونه‌های مورد بررسی از نظر درصد اسانس، تعداد و نوع ترکیب‌ها تنوع وجود دارد. به‌طوری‌که گونه *N. assurgens* با میزان ۰/۷۴ و گونه *N. racemosa* var. *crassifolia* با میزان ۰/۴۸ بیشترین درصد اسانس را به‌خود اختصاص دادند. سپس گونه‌های *N. cataria* با میزان ۰/۲۹ و گونه *N. kotschy* با میزان ۰/۲۰ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و از نظر درصد اسانس در سطح مطلوبی بودند. کمترین بازده اسانس مربوط به گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* با میزان ۰/۱ بود (جدول ۴). نتیجه‌های جدول ۴ نشان می‌دهد که بیشترین درصد ترکیب‌های اسانس در گونه‌های مورد بررسی، مربوط به نپتالاکون I (4a-α,7-α,7a-α-Nepetalactone)، نپتالاکون II (4a-α,7-β,7a-α-Nepetalactone) و ۸۰۱- سینئول است.

بر اساس نتیجه‌های بررسی حاضر در گونه *N. glomerulosa* تعداد ۴۸ ترکیب شناسایی شد. اجزای غالب اسانس در این گونه شامل: آلفا هومولن (۰/۱۲/۷۰)، هومولن آپوکساید (۰/۹/۹۰)، کاریوفیلین اکساید (۰/۹/۰۰)، کاریوفیلین (E) (۰/۷/۸۲) و ژرانیل استات (۰/۵/۴۰) بودند. نپتالاکون II به مقدار (۰/۱/۸۵) در این گونه شناسایی شد. در اسانس گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* تعداد ۳۷ ترکیب شناسایی شد. ترکیب غالب اسانس در این گونه را اسپاتولنول (۰/۱۴/۸۱) و کاریوفیلین اکساید (۰/۱۲/۴۳) تشکیل دادند. نپتالاکون نوع I به میزان (۰/۱/۷۰) و نوع II به میزان (۰/۲/۹۰) شناسایی شدند. در اسانس گونه *N. assurgens* تعداد ۵۰ ترکیب شناسایی شد. نپتالاکون I با مقدار (۰/۵۵/۵۱) و ترکیب ۸۰۱- سینئول (۰/۱۶/۷۹)، اجزای غالب اسانس را در این گونه تشکیل دادند. ایزومر نوع II نپتالاکون با مقدار (۰/۲/۷۱) نیز در اسانس این گونه شناسایی شد. در گونه *N. binaloudensis* تعداد ۳۵ ترکیب شناسایی شدند. نپتالاکون نوع I (۰/۵۹/۷۲) و ترکیب ۸۰۱- سینئول (۰/۱۹/۶۱) در اسانس این گونه جزء غالب اسانس را تشکیل دادند (جدول ۴).

جدول ۴- درصد ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس ۷ گونه پونه‌سای کشت شده.

Table 4. Percentage of identified compounds in essential oils of seven cultivated *Nepeta* species.

شماره No	ترکیب‌ها Compounds	شاخص بازداری †RI l	شاخص بازداری †RI c	††N.t	N.b	N.r	N.g	N.c	N.a	N.k
1	(E) -2-Hexenal	848	948	-	-	-	-	0.13	-	0.23
2	Tricyclene	919	919	-	-	-	-	-	0.13	-
3	α -Thujene	925	926 928	-	0.50	tr	-	tr	0.12	-
4	α -Pinene	933	932 939	0.32	0.61	0.43	0.32	0.14	3.61	Tr
5	Camphene	947	948	-	0.1	tr	-	tr	0.10	-
6	Benzaldehyde	959	959	-	-	-	-	-	-	Tr
7	Sabinene	972	973	-	0.83	0.23	-	0.13	1.72	-
8	1-Octen-3-ol	976	976	-	-	-	0.23	-	-	0.13
9	β -Pinene	977	978	-	1.82	1.22	-	-	4.6	-
10	3-Octanone	985	985	-	-	-	-	tr	0.2	0.2
11	Myrcene	990	992	-	0.44	0.12	0.12	tr	2.81	Tr
12	3-Octanol	995	994	-	-	0.12	0.21	-	-	0.11
13	n-Decane	1000	999	10.11	0.10	-	2.10	0.12	-	-
14	α -Phellandrene	1004	1006	-	0.20	0.11	0.12	-	-	-
15	α -Terpinene	1017	1016	-	0.31	0.00	0.10	tr	0.22	-
16	p-Cymene	1024	1024	0.21	4.20	0.33	1.00	0.11	0.10	-
17	Limonene	1028	1029	0.10	0.32	0.21	3.30	0.11	0.20	-
18	1,8-Cineole	1030	1031	0.40	19.61	9.42	1.70	0.52	16.81	-
19	(Z)- β -Ocimene	1036	1037	-	0.23	0.51	Tr	tr	0.92	0.10
20	(E)- β -Ocimene	1046	1046	-	0.10	0.11	0.42	0.10	0.22	0.41
21	γ -Terpinene	1057	1057	-	0.40	-	-	tr	0.22	-
22	cis-Sabinene hydrate	1066	1067	-	0.50	0.11	1.52	tr	0.23	-
23	n-Octanol	1068	1068	-	-	-	-	tr	-	-
24	trans-Linalool oxide	1071	1071	-	-	-	-	-	-	-
25	Terpinolene	1088	1089	-	0.30	-	0.21	0.12	0.20	-
26	Linalool	1099	1098	-	1.20	0.21	1.42	tr	0.91	0.10
27	n-Undecane	1100	1100	0.21	-	-	-	-	-	-
28	3-Methyl butyl 2- methyl butanoate	1104	1101	-	0.12	-	-	-	0.21	-
29	n-Nonanal	1105	1105	0.31	-	-	-	tr	-	-
30	Isopentyl isovalerate	1106	1106	-	-	-	-	-	0.12	-

جدول ۴- ادامه.

Table 4. Continued.

31	1-Octen-3-yl acetate	1112	1112	-	-	-	0.3	-	-	-
32	cis-p-Menth-2-en-1-ol	1121	1121	-	0.10	-	0.30	-	0.12	-
33	α -Campholenal	1126	1126	0.91	-	-	0.50	-	0.11	-
34	allo-Ocimene	1128	1128	-	-	-	-	-	0.10	-
35	trans-Pinocarveol	1138	1138	0.71	0.10	0.33	-	tr	0.22	-
36	Geijerene	1141	1141	-	-	-	-	-	0.1	-
37	trans-Verbenol	1144	1144	2.00	-	-	-	-	0.11	-
38	Camphor	1145	1145	-	tr	0.10	1.10	0.11	-	-
39	Citronellal	1152	1154	-	-	0.12	2.41	-	0.10	-
40	Pinocarvone	1162	1162	-	0.10	-	-	tr	0.10	-
41	δ -Terpineol	1166	1166	-	1.12	0.41	-	tr	0.92	-
42	Borneol	1167	1168	-	-	-	1.90	-	-	-
43	Terpinen-4-ol	1177	1178	-	1.11	0.40	2.71	tr	0.42	-
44	p-Cymen-8-ol	1185	1185	0.62	0.10	-	-	-	-	-
45	Cryptone	1186	1186	-	-	0.12	-	-	-	-
46	α -Terpineol	1190	1190	-	2.50	-	2.60	tr	1.90	Tr
47	Methyl salicylate	1194	1194	-	-	0.90	-	0.12	-	0.20
48	Myrtenal	1196	1196	0.80	0.12	0.20	-	-	-	-
49	Myrtenol	1196	1196	-	-	-	-	-	0.20	-
50	n-Dodecane	1219	1219	12.60	tr	-	2.31	tr	-	-
51	n-Decanal	1205	1205	0.4	-	-	-	-	-	-
52	Verbenone	1207	1207	1.2	-	-	0.3	-	-	-
53	trans-Carveol	1219	1217	0.31	0.50	4.12	-	0.80	2.20	2.71
54	Citronellol	1228	1228	-	-	-	-	-	0.10	-
55	Nerol	1229	1229	-	-	-	1.10	-	-	-
56	Neral	1238	1238	-	-	-	0.41	-	0.10	-
57	Carvone	1244	1244	-	-	-	0.32	-	-	-
58	Geraniol	1255	1254	-	-	-	1.60	tr	tr	-
59	Geranial	1269	1268	-	0.11	-	0.60	-	0.12	-
60	Bornyl acetate	1287	1287	-	-	-	2.90	-	-	-
61	δ -Elemene	1336	1336	-	-	-	-	-	0.10	-
62	4a-α,7-α,7a-α-Nepetalactone (I)	1358	1360	1.70	59.72	57.61	2.81	19.80	55.51	7.61
63	Neryl acetate	1366	1366	-	-	-	1.00	-	-	-

Table 4. Continued.

64	α -Copaene	1376	1376	2.41	-	-	0.70	-	-	-
65	β -Bourbonene	1384	1384	1.70	-	-	-	-	-	0.2
66	Geranyl acetate	1388	1388	-	-	-	5.4	-	-	-
67	4a-α,7-β,7a-α- Nepetalactone (II)	1392	1391	2.90	0.90	18.51	1.80	73.90	2.71	86.00
68	n-Tetradecane	1401	1402	5.92	-	-	1.00	-	-	-
69	Methyl eugenol	1407	1407	-	-	-	-	-	0.11	-
70	β -Funebrene	1413	1413	1.40	-	-	-	-	-	-
71	(E)- Caryophyllene	1419	1421	1.31	-	0.30	7.82	-	0.50	-
72	trans- α - Bergamotene	1438	1438	-	-	-	3.20	-	-	-
73	(Z)- β -Farnesene	1447	1447	-	-	-	1.82	-	-	-
74	Geranyl acetone	1453	1453	0.81	-	-	-	-	-	-
75	α -Humulene	1454	1453	-	-	-	12.70	0.12	0.12	0.11
76	(E)- β -Farnesene	1458	1457	2.80	-	0.42	-	0.81	tr	0.10
77	Neryl isobutanoate	1486	1486	-	-	-	2.51	-	-	-
78	allo- Aromadendrene	1460	1460	1.00	-	-	-	-	-	-
79	Germacrene D	1481	1483	-	-	-	-	-	0.10	0.62
80	(E)- β -Ionone	1486	1486	1.20	-	-	-	-	-	-
81	Bicyclogermacrene	1496	1496	-	-	-	-	-	0.21	-
82	β -Bisabolene	1508	1508	-	-	0.41	1.31	-	-	0.20
83	γ -Cadinene	1514	1514	0.50	-	-	-	-	-	0.12
84	β - Sesquiphellandrene	1521	1521	-	-	-	1.90	-	-	-
85	δ -Cadinene	1523	1525	0.51	-	-	1.70	-	-	-
86	Spathulenol	1578	1577	14.81	0.13	1.90	-	tr	0.41	0.12
87	Caryophyllene oxide	1581	1583	12.43	0.12	1.11	9.00	0.81	0.40	0.11
88	n-Hexadecane	1600	1600	2.81	-	-	-	-	-	-
89	Humulene epoxide II	1610	1610	-	-	-	9.90	-	-	-
90	epi- α -Cadinol	1641	1641	2.60	-	-	-	-	-	-
91	(Z)-Methyl jasmonate	1650	1650	-	-	-	-	-	-	0.11
92	α -Cadinol	1654	1654	1.42	-	-	-	-	-	0.23

جدول ۴- ادامه.

Table 4. Continued.

93	Geranyl valerate	1660	1660	-	-	-	-	-	-	0.11
94	n-Tetradecanoic acid	1769	1769	4.91	-	-	-	-	-	-
95	n-Octadecane	1800	1800	1.30	-	-	-	-	-	-
96	6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	1846	1846	3.61	-	-	-	-	-	-
تعداد ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس Number of identified compounds in EO				37	35	33	48	36	50	26
جمع کل ترکیب‌های شناسایی شده Total identified compounds in EO (%)				99.11	98.30	99.71	98.92	98.35	99.81	99.74
درصد عملکرد اسانس (وزنی/ حجمی) Oil yield (%v/w)				0.06 ^d	0.18 ^{cd}	0.48 ^b	0.20 ^{cd}	0.29 ^c	0.74 ^a	0.24 ^c

RII††RII (literature retention index), RIc (calculated retention index), tr - trace (<0.05%). ††*N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* (N. t), *N. binaloudensis* Jamzad (N. b), *N. racemosa* var. *crassifolia* (N.r), *N. glomerulosa* (N. g), *N. cataria* (N. c), *N. assurgens* (N. a), *N. kotschy* (N. k).

RII شاخص بازداری در منابع، RIc شاخص بازداری محاسبه شده، tr مقادیر کم (<0.05%).

بر اساس نتیجه‌های پژوهش حاضر، در اسانس گونه *N. cataria* ایزومرهای نیتالاکتون با مجموع ۹۳/۸۰٪ اجزای عمده اسانس را تشکیل دادند. تعداد ۳۶ ترکیب در اسانس این گونه شناسایی شدند. ایزومر نیتالاکتون I با میزان ۱۹/۸۵٪ و نیتالاکتون II با مقدار ۷۳/۹٪، ترکیب‌های غالب اسانس را تشکیل دادند. در گونه *N. racemosa* var. *crassifolia* تعداد ۳۳ ترکیب شناسایی شد. ایزومرهای نیتالاکتون در مجموع ۷۶٪ ترکیب‌های اسانس را تشکیل دادند. ایزومر I نیتالاکتون با میزان ۵۷/۶٪ و ایزومر II نیتالاکتون با مقدار ۱۸/۵۱٪ اجزای غالب اسانس را تشکیل دادند. در اسانس گونه *N. kotschy* تعداد ۲۶ ترکیب شناسایی شدند. اجزای غالب اسانس را ایزومرهای نیتالاکتون با مجموع ۹۳/۶۰٪ از کل ترکیب‌های اسانس را تشکیل دادند. نیتالاکتون II با میزان ۸۶٪ و نیتالاکتون I با میزان ۷/۶۱٪، ترکیب‌های عمده اسانس را تشکیل دادند.

بحث

محتوای فلاونوئید و فنول کل

در مورد بررسی محتوای فلاونوئید جنس پونه‌سا نیز گزارش‌های زیادی وجود ندارد. تمرکز بیشتر روی ترکیب‌های فنولی این جنس بوده است. با بررسی دو گونه توسط Tundis و همکاران (۳۷)، محتوای فلاونوئید کل در گونه *N. racemosa* var. *crassifolia* و گونه *N. binaloudensis* Jamzad به ترتیب با مقادیر ۱۰۹/۳ و ۳۸/۷ (میلی گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم ماده خشک) گزارش کردند و بر این اساس این گونه‌ها دارای محتوای فلاونوئیدی نسبتاً بالایی بودند. این مقادیر به مراتب کمتر از محتوای فلاونوئید گونه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر بود. در گزارشی توسط Zugic و همکاران (۳۹) محتوای فلاونوئیدی ناچیزی (کمتر از ۰/۱ میلی گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم ماده خشک) برای گونه *N. nuda* اعلام گردید. همچنین در گزارش دیگری توسط خلیقی سیگارودی و همکاران (۴) محتوای فلاونوئید کل گونه *N. pogonesperma* معادل ۲۴۹/۰۱ (میلی گرم روتین در هر گرم عصاره) گزارش شد. محتوای فنولیک عصاره‌های مختلف دو گونه *N. crassifolia* و *N. binaloudensis* Jamzad از گونه‌های بررسی شده در پژوهش حاضر نیز توسط Tundis و همکاران (۳۷) بررسی شد. گونه *N. rasemoca* var. *crassifolia* با میزان فنول کل ۹۱۲/۷ (میلی گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، فعالیت در حدود دو برابر بیشتر از گونه *N. binaloudensis* Jamzad با مقدار ۴۰۱/۲ (میلی گرم معادل اسید کلروژنیک در ۱۰۰ گرم) نشان داد. این مقدار به مراتب خیلی بیشتر از محتوای فنولی گونه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر بود. این اختلاف‌ها در نتیجه‌ها ممکن است به دلیل روش‌های سنجش مختلف و نوع حلال استفاده شده باشد. افزون بر این، شرایط محیطی نیز تأثیرگذار است (۳۵). این در حالی است که تمامی گزارش‌های موجود در مورد نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از طبیعت است، اما در بررسی حاضر از گیاه

کشت شده در زمین استفاده شد. به طور کلی، برای بیشتر گونه‌های این جنس محتوای فنولیک بالا گزارش شده است (۱۶). در بررسی توسط Tepe و همکاران (۳۵) برای گونه *N. flavida* بیشترین میزان فنول در عصاره متانولی و کمترین میزان در عصاره هگزانی گزارش شد. محتوای فنول کل در این گزارش کمتر از محتوای فنولی گونه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر بود. سیگارودی و همکاران (۴) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولیک عصاره‌های مختلف از گونه *N. pogonosperma* عصاره متانولی را دارای میزان فنول بیشتری گزارش کردند. به طور کلی، فعالیت‌های زیستی در گیاهان بیشتر به حضور ترکیب‌های فنولی، ترکیب‌های اسانس، نوع حلال و روش عصاره‌گیری بستگی دارد، به طوری که مشخص شده است که در بین حلال‌های مختلف، عصاره با حلال متانولی بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی را داشته است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در پژوهشی توسط Zugic و همکاران (۳۹) اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گونه *N. nuda* با استفاده از دو روش DPPH و FRAP بررسی گردید و مشخص گردید که این گونه با مقادیر ۱۴۸/۹۴ (میکروگرم در میلی گرم) و ۰/۱۱۹ (میلی مول آهن در وزن خشک)، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف است. در پژوهشی دیگر Koksai و همکاران (۱۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف آبی و متانولی گونه *N. trachonitica* را با استفاده از سه روش مختلف (CUPRAC, DPPH, FRAP) اندازه‌گیری کردند. بر اساس گزارش آن‌ها عصاره متانولی در روش CUPRAC^۲ بیشترین و در عصاره آبی کمترین فعالیت بازدارندگی را نشان داد. در روش FRAP هر دو عصاره فعالیت بازدارندگی کمتری نسبت به اسکوربیک اسید نشان دادند. در روش DPPH هر دو عصاره کمترین فعالیت بازدارندگی را نشان دادند (۱۸). در پژوهشی، Adiguzel و همکاران (۸) گزارش کردند که روش DPPH روش مؤثری برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیست، به طوری که عصاره متانولی گونه *N. cataria* درصد بازدارندگی ناچیزی با این روش نشان داد. در حالی که Cigremis و همکاران (۱۳) نشان دادند که روش DPPH روش مؤثری برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه *N. meyeri* است (۱۳). این نتیجه‌های متفاوت می‌تواند به این دلیل باشد که روش ارزیابی ویژگی آنتی‌اکسیدانی، شرایط واکنش، نوع حلال استفاده شده در استخراج و روش‌های استخراج ممکن است متفاوت باشد. سیگارودی و همکاران (۴) فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه *N. pogonosperma* با استفاده از دو روش ارزیابی نمودند. در روش DPPH مقدار IC₅₀ برابر با ۱۹۵/۸۷ معادل اسکوربیک اسید (۸/۲۲) میکروگرم در میلی لیتر، در روش ABTS مقدار IC₅₀ (۲۰۴۴/۱۲) و اسکوربیک اسید (۱۲۰/۱۲) میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد. آن‌ها این گونه را دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسط معرفی کردند. در بررسی توسط Tundis و همکاران (۳۷) در روش ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ABTS، مقدار IC₅₀ به دست آمده از عصاره متانولی گونه *N. racemosa* var. *crassifolia* (۱۳/۴) و گونه *N. binaloudensis* (۵۸/۱) معادل اسکوربیک (۱/۰) میکروگرم در میلی لیتر) گزارش شد. بر اساس گزارش آن‌ها این گونه‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا بودند. گونه *N. binaloudensis* در بررسی حاضر نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسطی را نشان داد. Tepe و همکاران (۳۵) اثرهای آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف (هگزان، دی‌کلرومتان، متانول) گونه *N. flavida* را بررسی کردند. آن‌ها مقدار IC₅₀ اسانس و عصاره متانولی را به ترتیب ۴۲/۸ و ۶۳/۲ (میکروگرم در میلی لیتر) گزارش کردند (۳۵).

نتیجه‌ها نشان دهنده وجود همبستگی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی است (شکل ۲). دیگر گزارش‌های پیشین، این همبستگی خطی بین محتوای فنول کل و DPPH IC₅₀ ($R^2=0.6274$) و حتی همبستگی قوی‌تر بین محتوای فنول کل و FRAP ($R^2=0.9496$) را تایید می‌کنند (۳۹، ۲۲، ۲۱). در پژوهش حاضر همبستگی بالایی بین محتوای فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی وجود نداشت. در دیگر گزارش‌ها توسط Iqbal و همکاران (۱۷) و Zugic و همکاران (۳۹) نیز همبستگی ضعیفی بین این ترکیب‌ها مشاهده شده است. بین گروهی از ترکیب‌های فنولیک (اسیدهای فنولیک، فلاونون و فلاونوئید) و IC₅₀ به ترتیب در روش DPPH ($R^2=0.1554$ ، ۰/۲۷۴۳، ۰/۴۹۴۱) و در روش FRAP ($R^2=0.336$ ، ۰/۳۴۰۳، ۰/۴۹۴۱) برای ترکیب‌های شناسایی شده وجود داشت. این نتیجه‌ها نشان داد که بین ترکیب‌های فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی همبستگی قوی وجود ندارد. گزارش شده است که حلال متانول بیشترین ترکیب‌های فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در گونه‌های *N. nepetella*

۳- Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP) -۲ Cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

N. bulgaricum و *N. cataria* استخراج میکند (۱۹، ۳۲). گزارش‌های متعدد نشان دهنده همبستگی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با اسانس و اجزای آن است. به‌طوری‌که همبستگی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های فنولیک در گونه‌های *N. cataria*، *N. meyeri* (۱۳)، *N. flavida* (۳۵)، *N. cataria* (۸) و *N. deflersiana* (۲۵) گزارش شده است. در بررسی حاضر نتیجه‌های حاصل از آنالیز اسانس گونه *N. binaloudensis* حاکی از این بود که اسانس دارای اجزای غالب ۸۰۱- سینئول و نپتالاکتون است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این ترکیب‌ها نیز پیش از این گزارش شده است (۳۷، ۳۵، ۲۶، ۱۶).

ترکیب‌های اسانس

بر اساس گزارش‌های موجود در منابع، ترکیب عمده اسانس در گونه *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* بتاکاریوفیلین و کاریوفیلین اکساید است. در اسانس این گونه تعداد ۴۲ ترکیب با اجزای غالب اسانس بتاکاریوفیلین (۱۷/۶٪) و کاریوفیلین اکساید (۱۲/۳٪) توسط سفیدکن و همکاران (۳۲) گزارش شده است. در بررسی حاضر ترکیب غالب اسانس این گونه، اسپاتولنول (۹/۱۴٪) و کاریوفیلین اکساید (۱۲/۴٪)، شناسایی شدند. سفیدکن (۳۱) نیز در اسانس *N. glomerulosa* تعداد ۲۸ ترکیب با اجزای اصلی اسانس آلفاپینن (۹/۴٪) و ژرانیل استات (۹/۳٪) گزارش کردند. نزهادی و همکاران (۲۷) تعداد ۵۲ ترکیب با اجزای غالب گلیسرول استات، لیمونن و ۸۰۱- سینئول و سیترونلال را به‌ترتیب با مقادیر ۵، ۱۷ و ۴٪ در اسانس این گونه شناسایی کردند که در بررسی حاضر در اسانس این گونه (۲/۴٪) سیترونلال شناسایی شد. مقایسه نتیجه‌های این بررسی با سایر گزارش‌های موجود، تنها تفاوت‌های جزئی در مقادیر و تعداد ترکیب‌های اصلی اسانس را نشان می‌دهد و همچنین تفاوت دیگر، حضور ترکیب نپتالاکتون II به مقدار ۱/۸۵ درصد، در این گونه بود. در هیچ‌کدام از مقالات چاپ شده موجود در مورد اسانس این گونه ترکیب نپتالاکتون گزارش نگردیده و این گونه در گروه گونه‌های فاقد نپتالاکتون گزارش شده است. گزارش‌های موجود در مورد ترکیب اسانس گونه *N. binaloudensis*، شامل ترکیب ۸۰۱- سینئول به عنوان ترکیب عمده اسانس و همچنین مقادیر قابل توجهی از ایزومر ۴a- آلفا، ۷- آلفا- ۷a- آلفا نپتالاکتون (۵۲٪) بوده است (۲۶). در بررسی دیگری توسط روستاییان و ناجی (۳۰) روی اسانس *N. binaloudensis* تعداد ۱۱ ترکیب شناسایی گردید، که بیش‌ترین درصد ترکیب‌های اسانس، شامل: گاماترپین (۶۸٪) و ۸۰۱- سینئول (۳۲٪) بودند. بر اساس نتیجه‌ها بررسی حاضر در گونه *N. binaloudensis* نیز ترکیب‌های غالب اسانس، نپتالاکتون نوع I (۹۶/۵٪) و ترکیب ۸۰۱- سینئول (۹۶/۲٪) بودند. در مورد گزارش‌های موجود در ترکیب‌های اسانس گونه *N. assurgens* گزارش اخگر و همکاران (۹)، تعداد ۲۲ ترکیب را با اجزای اصلی، نپتالاکتون (۴۷٪) و ۸۰۱- سینئول (۲۱٪) در اسانس این گونه گزارش کردند. در بررسی حاضر در گونه *N. assurgens* نیز ترکیب‌های نپتالاکتون I (۵۵/۵۰٪) و ۸۰۱- سینئول (۱۶/۷۹٪) اجزای اصلی اسانس را تشکیل دادند. دبیری و سفیدکن (۱۴)، ایزومر نپتالاکتون I به میزان (۹۲/۸٪)، مرتضی سمنانی و سعیدی (۲۴) ایزومر نپتالاکتون II به مقدار (۸۱٪) را بعنوان ترکیب عمده اسانس در گونه *N. crassifolia* گزارش کردند. ترکیب‌های اصلی اسانس در گونه *N. kotschy* ایزومرهای نپتالاکتون گزارش شده است (۲۸، ۶). همچنین حضور ترکیب نپتالاکتون در گونه *N. cataria* در حدود (۳۱ درصد) و نپتالاکتون II در حدود (۵۵٪) توسط زمردیان و همکاران (۳۸) گزارش شده است. در سایر گزارش‌های موجود، حضور ایزومرهای نپتالاکتون II (۸/۲۸٪)، نپتالاکتون I (۱۳/۵٪) در گونه *N. Persica* توسط شفت و اوجی (۳۳) و نپتالاکتون I (۸۰٪) توسط محبوبی و همکاران (۲۰) شناسایی شده است. هادی و همکاران (۶) با بررسی تنوع اسانس ۳۳ توده از گونه‌های *N. kotschy*، *N. mentoiede*، *N. cataria*، *N. crassifolia* در شرایط کشت شده، بیشترین میزان نپتالاکتون را در گونه *N. cataria* (۱/۸-۹۹/۹۷٪) و در *N. kotschy* (۹۴/۳-۹۳/۵٪) گزارش کردند.

نپتالاکتون‌ها، بسته به فرم ایزومری فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی را نشان می‌دهند. فرم سیس - ترانس نپتالاکتون نسبت به فرم ترانس- سیس نپتالاکتون- خاصیت سمیت بالاتری برای حشرات دارد و به‌صورت قویتری عمل می‌کند. هر دو ایزومر دارای فعالیت دورکنندگی می‌باشند، اما سیس- ترانس دارای فعالیت قویتری در برابر هلیکوباکتری است که برای سلامتی انسان مورد توجه می‌باشند. نتیجه‌های بررسی حاضر و گزارش‌های متعدد در مورد ترکیب‌های اسانس گونه‌های مختلف پونه‌سا نشان می‌دهد که بعضی گونه‌های این جنس حاوی مقادیر بالایی از ترکیب‌های ایزومرهای نپتالاکتون و مشتقات آن می‌باشند و همچنین برخی از این گونه‌های بالارزش این جنس قبلاً توسط هادی و همکاران (۶، ۱۹) معرفی شده‌اند.

بر اساس نتیجه‌های بررسی حاضر می‌توان گونه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر را در سه گروه قرار داد. گروه اول گونه‌های دارای ترکیب‌های غالب هومولن و کاریوفیلین می‌باشند و ایزومرهای نپتالاکتون در مقادیر جزئی نیز در این گونه‌ها وجود داشت.

این گروه شامل گونه های *N. glomerulosa*, *N. teucrifolia* subsp. *teucrifolia* می باشند این دو گونه دارای میزان اسانس کم و هم چنین درصد ترکیب های اسانس و ایزومرهای نپتالاکتون در مقادیر کم و جزیی می باشند گروه دوم شامل گونه های است که ترکیب غالب اسانس آن ها ۸،۱- سینئول بوده و ایزومرهای نپتالاکتون در مقادیر قابل توجهی در این گونه ها یافت می شود، شامل گونه های *N. assurgens*, *N. binaoludensis* Jamzad می شود. گونه های *N. kotschy*, *N. cataria*, *N. crassifolia* در گروه آخر قرار می گیرند. این گونه ها به علت داشتن ترکیب های نپتالاکتون به میزان بالا در اسانس به عنوان گونه های ارزشمند دارویی انتخاب می شوند.

نتیجه های بررسی حاضر در تمامی گونه های مورد بررسی در راستای نتیجه های گزارش های موجود در منابع مورد بررسی می باشد، تنها تفاوت های جزیی در تعداد و درصد ترکیب های وجود دارد. به نظر می رسد این تفاوت ها به علت سازگاری با تنش های زنده و غیر زنده، شرایط آب و هوایی و خاک متفاوت باشد. از آن جایی که گونه های پونه سا در دامنه وسیعی از شرایط محیطی کشور، از شرق تا شمال غربی از شرایط مرطوب شمال تا شرایط خشک جنوب شرق پراکنده می باشند. این تفاوت در نتیجه ها را می توان تا حدودی به شرایط محیطی مختلف نسبت داد. کاشت جمعیت های مختلف در شرایط محیطی یکسان، اثرهای محیطی را در نوع و میزان ماده های مؤثره کاهش داده و تنوع حاصل از اختلاف های ژنتیکی را بهتر نمایان می سازد. این تنوع راه را برای معرفی گونه های مطلوب و مناسب از نظر ویژگی های رویشی و ترکیب های ماده های مؤثره هموار خواهد کرد. آگاهی از جنبه های فیتوشیمیایی گیاهان دارویی ما را در تعیین استراتژی های بهره برداری، به نژادی و اهلی سازی یاری می کند (۵).

نتیجه گیری

نتیجه های بررسی حاضر به طور شفاف مشخص می کند که گونه های بررسی شده غنی از ترکیب های فنولی و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی می باشند. تمایل به سمت استفاده از گیاهان دارویی به عنوان منابع طبیعی جایگزین آنتی اکسیدان های سنتزی می توان این گونه ها را به عنوان منابع بارزش آنتی اکسیدان طبیعی در نظر گرفت. افزون بر این، گونه هایی که دارای ترکیب اصلی اسانس نپتالاکتون می باشند، به علت داشتن فعالیت های زیستی ارزشمند این ترکیب دارای اهمیت دارویی بالایی می باشند. به طور کلی از نظر حضور ایزومرهای نپتالاکتون در ترکیب های اسانس، گونه های *N. cataria*, *N. kotschy* بالاترین میزان نپتالاکتون II و گونه *N. racemosa* var. *crassifolia* بیشترین مقدار نپتالاکتون I وجود داشت.

سپاسگزاری

واکوی اسانس گونه های مورد بررسی در این پژوهش در آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس انجام شد. بدین وسیله از همکاری صمیمانه آقای دکتر وحید روشن و تمامی پرسنل سپاسگزاری می شود.

References

منابع

۱. آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی سال ۱۳۹۵. شبکه خبری گیاهان دارویی (www.medplant.ir).
۲. امیدبگی، ر.، ۱۳۹۴. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول، چاپ هفتم، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد. ۴۳۸ص.
۳. جمزاد، ز.، ۱۳۹۱. فلورایران (تیره نعنا Lamiaceae)، انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور. ۱۰۷۲ صفحه.
۴. خلیقی- سیگارودی، ف.، م. اهوازی، ح. ابراهیم زاده، و ن. رحیمی. ۱۳۹۲. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و اثرهای آنتی اکسیدانی، محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی عصاره *Nepeta pogonosperma* مجله گیاهان دارویی، ۲: ۲۹-۳۵.
۵. عزیزی، م.، قاضیان، گ. و میرمصطفایی، س. فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، ۱۳۹۴. جلد اول، چاپ اول، انتشارات نخست، ۳۸۸ص.
۶. هادی، ن.، ف. سفیدکن، ع. شجاعیان و ع. ا. جعفری. ۱۳۹۱. بررسی تنوع اسانس جمعیت ۲۱ گونه انحصاری *Nepeta* spp در ایران، دو ماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۰۲-۱۸۹: ۳۲.
7. Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by Gas chromatography/Mass Spectroscopy. Llured, Coral Stream, IL, 456p.

8. Adiguzel, A., H. Ozer, M. Sokmen, M. Gulluce, A. Sokmen, H. Kilic, F. Sahin, and O. Baris. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. Pol. J. Microbiol. 58: 69-76.
9. Akhgar, M.R., S. Jafari, and M. Moradalizadeh. 2012. Chemical composition of the essential oil of *Nepeta assurgens* Hausskn. Ex Bornm. T. Mod. Chem. 2: 31-35 .
10. Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-76.
11. Carvalho, I., S. T. Cavaco and M. Brodelius. 2011. Phenolic composition and antioxidant capacity of six *Artemisia* species. Ind. Crops. Prod. 33(2):382-388.
12. Chen, Z., R. Bertin and G. Foldi. 2013. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. Food Chem. 138(1): 414-420.
13. Cigremis, Y., Z. Ulukanli, A. Ilcim, and M. Akgoz. 2010. In vitro antioxidant and antimicrobial assays of acetone extracts from *Nepeta meyeri* Benth. Med. Pharmacol. Sci. 14: 661-668.
14. Dabiri, M. and F. Sefidkon. 2003. Chemical composition of *Nepeta crassifolia* Boiss. And Buhse oil from Iran. Flavour. Fragrance. J. 18: 225-227.
15. Formisano, C., D. Rigano, and F. Senatore. 2011. Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species. Chem. Biodiv. 8: 1783-1818.
16. Hadi, N., F. Sefidkon, A. Shojaeiyan, B. Siler, A.A. Jafari, N. Anicic, and D. Misic. 2017. Phenolics' composition in four endemic *Nepeta* species from Iran cultivated under experimental field conditions: The possibility of the exploitation of *Nepeta* germplasm. Ind. Crops. Prod. 95: 475-484.
17. Iqbal, S., U. Younas, K.W. Sirajuddin, R.A. Sarfraz, and M. K. Uddin. 2012. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of *Mulberry* (*Morus* sp.): a comparative study. Int. J. Mol. Sci. 13: 6651-6664.
18. Koksai, E., H. Tohma, Ö. Kılıç, Y. Alan, A. Aras, İ. Gulcin, and E. Bursal. 2017. Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Nepeta trachonitica*: analysis of its phenolic compounds using HPLC-MS/MS. Sci. Pharm. 85(2): 24-31.
19. Kraujalis, P., P. R. Venskutonis, and O. Ragazinskiene. 2011. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from *Nepeta* plant species. In Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology foodbalt: In novatops for Food science and Production. 5-6.
20. Mahboubi, M., N. Kazempour, F. Ghazian, and M. Taghizadeh. 2011. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Nepeta persica* Boiss. Essen. oil. Herba Polonica. 57(1):62-71.
21. Maksimovic, Z., D. Malencic, and N. Kovacevic. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. Bior. Technol. 96: 873-877.
22. Malencic, D., Z. Maksimovic, M. Popovic, and J. Miladinovic. 2008. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. Bior. Technol. 99: 6688-6691 .
23. Marinova, G., and V. Batchvarov. 2011. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. Bulg. J. Agr. Sci. 17(1): 11-24.
24. Morteza-Semnani, K. and M. Saeedi. 2004. Essential oils composition of *Nepeta cataria* L. and *Nepeta crassifolia* Boiss. And Buhse from Iran. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 7: 120-124.
25. Mothana, R. A. 2012. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Nepeta deflersiana* growing in Yemen. Rec. Nat. Prod. 6(2):189-193.
26. Nadjafi, F., A. Koocheki, B. Honermeier, and J. Asili. 2009. Autecology, ethnomedicinal and phytochemical studies of *Nepeta binaludensis* Jamzad a highly endangered medicinal plant of Iran. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 12: 97-110.
27. Nezhadali, A., M. Masrornia, H. Bari, M. Akbarpour, M.R. Joharchi and M. Nakhaei-Moghadam. 2011. Essential oil composition and antibacterial activity of *Nepeta glomerulosa* Boiss from Iran. J. Essen. Oil-Bear. Plants. 14(2): 241-244.
28. Nori-Shargh, D., B. Baharvand, and F. Deyhimi. 2006. The volatile constituents' analysis of *Nepeta kotschy* Boiss. From Iran. J. Essent. Oil Res. 18: 237-238.

29. Papoti, V. T., S. Xystouris, G. Papagianni, and M. Z. Tsimidou. 2011. Total flavonoid" content assessment via aluminum complexation reactions. What we really measure. Ital. J. Food Sci. 23: 252-259.
30. Rustaiyan, A. and K. Nadji, 1999. Composition of the essential oils of *Nepeta ispahanica* Boiss and *Nepeta binaludensis* Jamzad from Iran. Flavour. Fragrance. J. 14(1): 35-37.
31. Sefidkon, F. 2001. Essential oil of *Nepeta glomerulosa* Boiss. From Iran. J. Essent. Oil Res. 13(6): 422-423.
32. Sefidkon, F., M. Dabiri, and A. Alamshahi. 2002. Analysis of the essential oil of *Nepeta fissa* CA Mey from Iran. Flavour. Fragrance J. 17(2):89-90.
33. Shafaghat, A and K. Oji. 2010. Nepetalactone content and antibacterial activity of the essential oils from different parts of *Nepeta persica*. Nat. Prod. Commun. 5: 625-628.
34. Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299:152-178.
35. Tepe, B., D. Daferera, A. S. Tepe, M. Polissiou and A. Sokmen. 2007. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub. -Mor. from Turkey. Food Chem. 103(4): 1358-1364.
36. Trim, A. R., and R. Hill. 1952. The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides. Biochem. J. 50(3): 310.
37. Tundis, R., F. Nadjafi and F. Menichini. 2013. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant properties of *Nepeta crassifolia* Boiss & Buhse and *Nepeta binaludensis* Jamzad. Phytother. Res. 27: 572-580.
38. Zomorodian, K., M. J. Saharkhiz, S. Shariati, K. Pakshir, M. J. Rahimi, and R. Khashei. 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Nepeta cataria* L. against common causes of food-borne infections. Int.J. Pharm. 13(5): 1-6.
39. Zugic, A., S. Dordevic, I. Arsić, G. Markovic, J. Zivkovic, S. Jovanovic, and V. Tadic. 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. Ind. Crops Prod. 52: 519-527.

Comparison of Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Seven *Nepeta* species Cultivated in Mashhad

F. Z. Amirmohammadi, M. Azizi* and S. H. Nemati¹

In the present research, phytochemical composition and antioxidant activity of seven *Nepeta* species (*Nepeta teucriifolia* subsp. *teucriifolia*, *N. assurgens*, *N. glomerulosa*, *N. cataria*, *N. binaloudensis*, *Na. racemosa* var. *crassifolia*) from field cultivated plant (Research garden of Agricultural Faculty of Ferdowsi University of Mashhad) in a completely randomized design with 3 replications were investigated. Total iridoid, flavonoid content (FC), total phenol (TP) content and antioxidant capacities (AC), were determined using spectrophotometer. The essential oils, were analyzed by GC/MS. The TP content ranged from 186.47 to 464.25 mg of gallic acid equivalents (mg (GAE) 100 g⁻¹ DW). The highest and the lowest amount of FC with values of 43.08 and 142.20 (mg quercetin equivalents 100 g⁻¹ DW) for *N. glomerulosa* and *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* respectively. The AC values of the species ranged from 117 to 287.33 µg mg⁻¹ DW extract (by DPPH method) and from 66.678 to 81.096 Mm Fe (by FRAP method) respectively. The highest and lowest amount of essential oil percent (v/w) was obtained in *N. assurgens* (0.74) and in *N. fissa* (0.06), respectively. Depending on the result of this research, on the basis of main compound identified in the essential oils, *Nepeta* species have been divided in to three groups. First group species like; *N. teucriifolia* subsp. *teucriifolia* and *N. glomerulosa* which contain Caryophyllene oxide and Humulene as their main compounds. The species of the second group contain Nepetalactone isomers and 1.8-cineole as their key compounds. These species including *N. binaloudensis* and *N. assurgens* species. The species of the last group contain Nepetalactone as their key compounds; this species including; *N. cataria*, *N. kotschyi*, *N. racemosa* var. *crassifolia*.

Keywords: *Nepeta*, Nepetalactone, FRAP, DPPH, Phenol, Flavonoid.

1. Former M.Sc. Student, Professor of Medicinal Plants Production and Processing of Agriculture and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (Azizi@um.ac.ir).