سیزدهمین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار
2022 HAMEDAN Conferences and Congresses center of Bu-Ali Sina Farazandishan

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر ترکیبات فنلی و اسانسی گیاه نعناع فلفلی

اکرم شنوایی زارع[۱]، علی گنجعلی[۲]، محمدرضا واعظی کاخکی[۳]، منصور مشرقی [۴]، منیره چنیانی[۵]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، نویسنده مسئول، ایمیل: ashenavaie@yahoo.com
۲. عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری
۴. عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵. عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

نعناع فلفلی به دلیل داشتن ترکیبات اسانسی فرار، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و معطر می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر روی ترکیبات فنلی و اسانسی گیاه نعناع فلفلی انجام شد. نتایج نشان داد که کاربرد نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید باعث افزایش مقدار ترکیبات فنلی کل، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید شده است. براساس نتایج بدست آمده، غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تأثیر مثبت بیشتری بر افزایش ترکیبات فنلی کل و مقدار رزمارینیک اسید داشته است. علاوه بر این، کاربرد نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید، میزان ترکیبات اسانس نعناع فلفلی مانند منتول، منتیل استات و ۱، ۸ سینئول را افزایش داد. به‌طورکلی، کاربرد نانوذرات محرک مناسبی برای افزایش ترکیبات فنلی و اسانسی در گیاهان دارویی می‌باشد.

کلمات کلیدی: رزمارینیک اسید/کافئیک اسید/ نانوذرات/ منتول

۱– مقدمه

گیاه نعناع فلفلی یکی از مهم‌ترین و باارزش‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد. در طب سنتی از نعناع فلفلی برای کاهش اشتها، سرماخوردگی، سرفه، تب، تهوع، سردرد، آماس روده بزرگ، ضد گرفتگی عضله، ضد نفخ و سوءهاضمه استفاده می‌شود. اثرات ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضدویروسی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد حساسیتی و حشره‌کشی این گیاه گزارش شده است (Shah and Mello ۲۰۰۴). اندام هوایی نعناع فلفلی دارای اسانس، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها، عناصر معدنی و اسید سالیسیلیک است (Seif sahandi et al. ۲۰۱۸). اسانس گیاه نعناع فلفلی عمدتاً از منتول

[1](۴۸-۲۹ درصد)، منتون[2] (۳۱-۲۰ درصد)، منتوفوران [3](۶/۸ درصد) و منتیل استات [4](۱۰-۳ درصد) تشکیل شده است (Singh and Misra ۲۰۰۱). منتول مهم‌ترین ترکیب اسانس است که درون کرک‌های غده‌ای ترشحی در سطح اپیدرم برگ بیوسنتز و تجمع می‌یابد (Seif sahandi et al. ۲۰۱۸). اسانس نعناع فلفلی همچنین دارای ترکیباتی مانند لیمونن[5]، سینئول[6]، ایزومنتون[7]، ایزوپولگول[8]، پولگون[9] و کارون[10] می‌باشد (Loolaie et al. ۲۰۱۷). نتایج مطالعه Pramila و همکاران (۲۰۱۲) داد که عصاره الکلی نعناع فلفلی دارای ترکیبات تانینی و فلاونوئیدی است، درحالی‌که فاقد ترکیبات گلیکوزیدی، ساپونین‌ها، مشتقات آنتراکوئینون و آلکالوئیدها بود (Pramila et al. ۲۰۱۲). سایر ترکیبات شامل گلوکوزیدهای فلاونوئیدی (مانند ناریروتین[11]، ایزورویفولین[12]، هسپریدین[13]، اریوسیترین[14]، دیوزمین[15] و لوتئولین-۷-o- روتینوزید[16])، پلی‌فنل‌ها (مانند رزمارینیک اسید[17]، کافئیک اسید[18]، سینامیک اسید[19] و ناریژنین-۷-o- گلوکوزید[20]) و لوتئولین دی گلوکوارونید[21] از بخش‌های هوایی گیاه نعناع فلفلی استخراج و شناسایی شده است (Loolaie et al. ۲۰۱۷).

متغیرهای مختلفی مانند غلظت الیسیتور، انتخاب پذیری، زمان استفاده از الیسیتور، محیط کشت ترکیبات مواد غذایی و کیفیت مواد دیواره سلولی عوامل مؤثر بر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌باشند (Ganapathi and Kargi ۱۹۹۰). اهمیت الیسیتورها به دلیل نقش کلیدی آنها در افزایش ترکیبات فعال دارویی است (Singh and Dwivedi ۲۰۱۸). این ترکیبات از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. نانوذرات (NPs) به‌عنوان مجموعه‌های مولکولی یا اتمی با حداقل ابعاد ۱-۱۰۰ نانومتر در نظر گرفته می‌شوند (Marslin et al. ۲۰۱۷). استفاده از نانوذرات به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در سال‌های اخیر موردتوجه است. به‌عنوان‌مثال محتوای ترکیبات دارویی نظیر آرتمیزینین[22] و دیوزژنین[23] در گیاهان تیمار شده با نانوذرات افزایش یافته است (Zhang et al. ۲۰۱۳). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که تیمار گیاهان و میکروارگانیسم‌های فتوسنتزی با نانو ذرات، منجر به افزایش تولید ترکیبات فنلی شده که ممکن است به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها عمل کنند.گوهری و همکاران (۲۰۲۰) اخیراً دریافته‌اند که کاربرد نانوذرات به‌طور قابل‌توجهی خواص فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی *Dracocephalum moldavica* را تغییر می‌دهد (Gohari et al. ۲۰۲۰). با توجه به اهمیت دارویی گیاه نعناع فلفلی و تأثیر مثبت الیسیتورها در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر الگوی تغییرات ترکیبات اسانسی و فنلی گیاه نعناع فلفلی انجام شده است.

---

[1]- Menthol
[2]- Menthon
[3]-Menthoforan
[4]- Menthyl acetate
[5]- Limonen
[6] - Cineol
[7]- Isomenthone
[8] - Isopulegol
[9]- Pulegone
[10]- Carvone
[11]- Narirutin
[12]- Isorhoifolin
[13] - Hesperidin
[14]- Eriocitrin
[15] - Diosmin
[16]- Luteolin-۷-o-rutinoside
[17]- Rosmaric acid
[18]- Caffeic acid
[19]- Cinamic acid
[20]- Narigenin-۷-oglucoside
[21]- Luteolin-diglucoronide
[22]- Artemisinin
[23]- Diosgenis

۲- روش تحقیق

۲-۱- کشت گیاه نعناع فلفلی، اعمال تیمارها و برداشت گیاه

ریزوم‌های گیاه نعناع فلفلی از دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. سپس ریزوم‌ها در گلدان‌های حاوی کوکوپیت، ورمی کمپوست، خاک برگ و پرلیت به نسبت‌های مساوی، کشت شدند. پس از تکثیر و یکدست‌سازی، در هر گلدان دو تا سه نشاء سالم کاشته شد و آبیاری گلدان‌ها به‌صورت روزانه در شرایط یکسان انجام شد. هم‌زمان با کاشت ریزوم‌ها و همچنین ۳۰ روز پس از کاشت، کود NPK به میزان ۳۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خاک، به‌صورت محلول به گلدان‌ها افزوده شد. محلول نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید در غلظت‌های مختلف ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شدند و قبل از هر بار استفاده به‌منظور جلوگیری از رسوب در حمام التراسونیک قرار گرفتند. در این آزمایش تأثیر توأم سه سطح مختلف از غلظت نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر) بر سنتز ترکیبات فنلی و اسانسی بررسی می‌شود. در این مطالعه، یک ماه پس از کاشت نشاها، اسپری برگی نانوذره، هفت مرتبه (هفته‌ای یک‌بار) در طی پنجاه روز انجام شد. برداشت نمونه‌های گیاهی نعناع فلفلی، ۲۴ ساعت بعد از آخرین مرحله محلول‌پاشی صورت گرفت. به این منظور بخش هوایی گیاهان برای بررسی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حدود ۵۰ گرم از بافت تازه گیاهی هر تیمار برای استخراج اسانس استفاده شد.

۲-۲- سنجش ترکیبات فنلی

برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی از روش Sadasivam و Manickam (۲۰۰۸) با اندکی تغییرات استفاده شد. در این آزمایش، ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاهی را در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد سائیده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر عصاره‌گیری کامل شد. سپس مخلوط حاضر در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و از محلول رویی جهت تعیین ترکیبات فنلی کل استفاده شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ درصد اضافه شد. سپس ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن اضافه گردید. پس‌ازآن جذب هر نمونه در طول‌موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. محاسبه غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از اسید گالیک منحنی استاندارد رسم گردید و غلظت ترکیبات فنلی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر گزارش گردید (Sadasivam and Manickam ۲۰۰۸).

۲-۳- اندازه‌گیری رزمارینیک اسید

۰,۱ گرم پودر خشک گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد سائیده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره‌های حاصل توسط کاغذ صافی معمولی صاف شدند. جذب عصاره‌های متانولی در ۳۳۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت رزمارینیک اسید تعیین شد (Tepe and Sokmen ۲۰۰۷).

۲-۴- اندازه‌گیری کافئیک اسید

برای سنجش کافئیک اسید از روش ساوستی و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. نمونه‌ها روی یخ و با کمک متانول ۸۰ درصد به نسبت ۱،۵ وزنی/ حجمی تا حصول یک محلول همگن سائیده شدند. محلول همگن حاصل به مدت سه ساعت در دمای ۴۰ درجه هم زده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی برای سنجش کافئیک اسید استفاده گردید. یک میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی ۸۰ درصد را برداشته و به آن یک میلی‌لیتر معرف آرنو، یک میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید یک مولار، یک میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۰،۱ مولار افزوده شد، سپس ورتکس کرده و بلافاصله جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. در نمونه شاهد به‌جای عصاره، یک میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت کافئیک اسید تعیین شد.

۲-۵- شناسایی ترکیبات ترپنوئیدی در اسانس گیاه

جهت استخراج اسانس گیاه نعناع فلفلی از روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس‌گیر طرح کلونجر استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از اندام هوایی نعناع فلفلی به همراه ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بالن مخصوص دستگاه ریخته شد و عمل اسانس گیری به مدت ۳ ساعت ادامه یافت و مایع روغنی بدست آمده به‌وسیله ماده جاذب رطوبت (سولفات سدیم) خشک شد. اسانس‌های به‌دست‌آمده به‌دقت توزین شده و در ظرف‌های تیره‌رنگ تا هنگام آنالیز GC-MASS در یخچال و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های اسانس برای آنالیز GC-MASS به پژوهشگاه علوم و صنایع غذایی مشهد فرستاده شدند. اسانس‌های به‌دست‌آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر تزریق شد. برای آنالیز اسانس‌ها از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مدل ۵۹۷۷(USA) A, Agilent technologies، مجهز به ستون HP-۵MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰،۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰،۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آون از ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان یک میلی‌متر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت استفاده شد. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامتر زمان بازداری (RT) مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MASS صورت گرفت (Adams., ۲۰۰۱). درصد نسبی هرکدام از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد.

۲-۶- آنالیز داده‌ها

آزمایش‌ها بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.۱۷ صورت گرفت و میانگین‌ها برای صفات اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵٪ مقایسه شدند. رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱- ترکیبات فنلی کل

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده با نانوذره به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گیاهان شاهد، افزایش معنی‌داری داشته است. در این بررسی، کاربرد ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر میزان ترکیبات فنلی کل (۴۸,۸ میلی‌گرم در گرم وزن‌تر گیاه) در مقایسه با غلظت‌های دیگر، مؤثرتر بود. کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید در مقایسه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر مثبت کمتری بر افزایش محتوی ترکیبات فنلی گیاه داشت (شکل 1a).

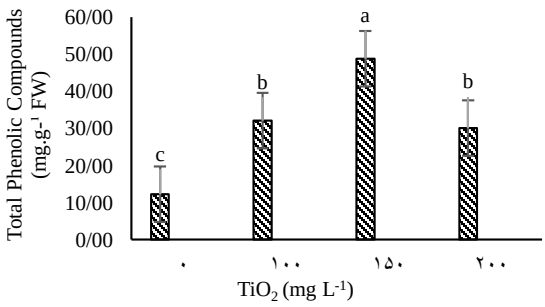
۳-۲- رزمارینیک اسید

نتایج حاصل نشان داد که نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید تأثیر معنی‌داری بر مقدار رزمارینیک اسید گیاه نعناع فلفلی داشته است. مطابق نتایج بدست آمده، بیشترین مقدار رزمارینیک اسید (۸۰,۷۵ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک) در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید مشاهده شد، که در مقایسه با نمونه شاهد (۶۳,۲۶ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک) افزایش ۲۷,۶۴ درصدی داشته است، و تفاوت آن با سایر غلظت‌ها معنی‌دار بود (شکل 1b). کمترین میزان رزمارینیک اسید (۶۱,۴۲ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره مشاهده شده است.

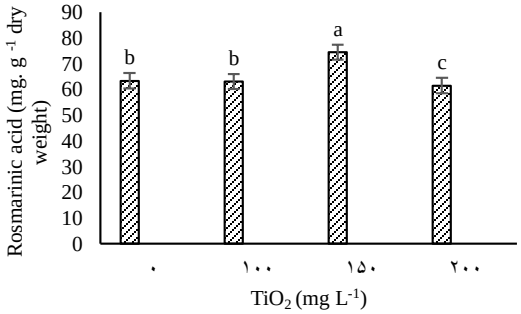
۳-۳- کافئیک اسید

با توجه به نتایج بدست آمده، نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید تأثیر معنی‌داری بر مقدار کافئیک اسید گیاه نعناع فلفلی داشته است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین میزان کافئیک اسید (۶۵,۱۶ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک) مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بود، که تفاوت آن با سایر تیمارها به‌استثنای غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، معنی‌دار بود (شکل 1c).

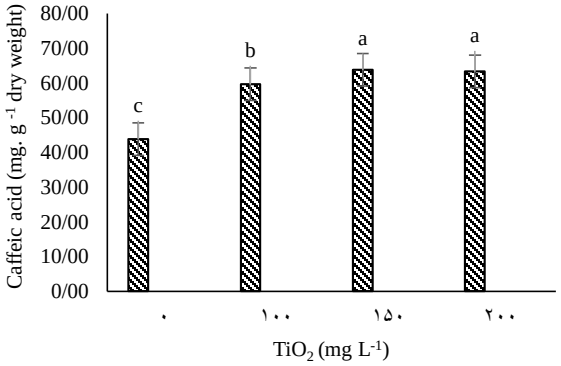
(a)



(b)



(c)



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر روی صفات بیوشیمیایی گیاه نعناع فلفلی (a) ترکیبات فنلی کل (میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر گیاه) (b) رزمارینیک اسید (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه) (c) کافئیک اسید (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک ازنظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند ($P \leq ۰,۰۵$).

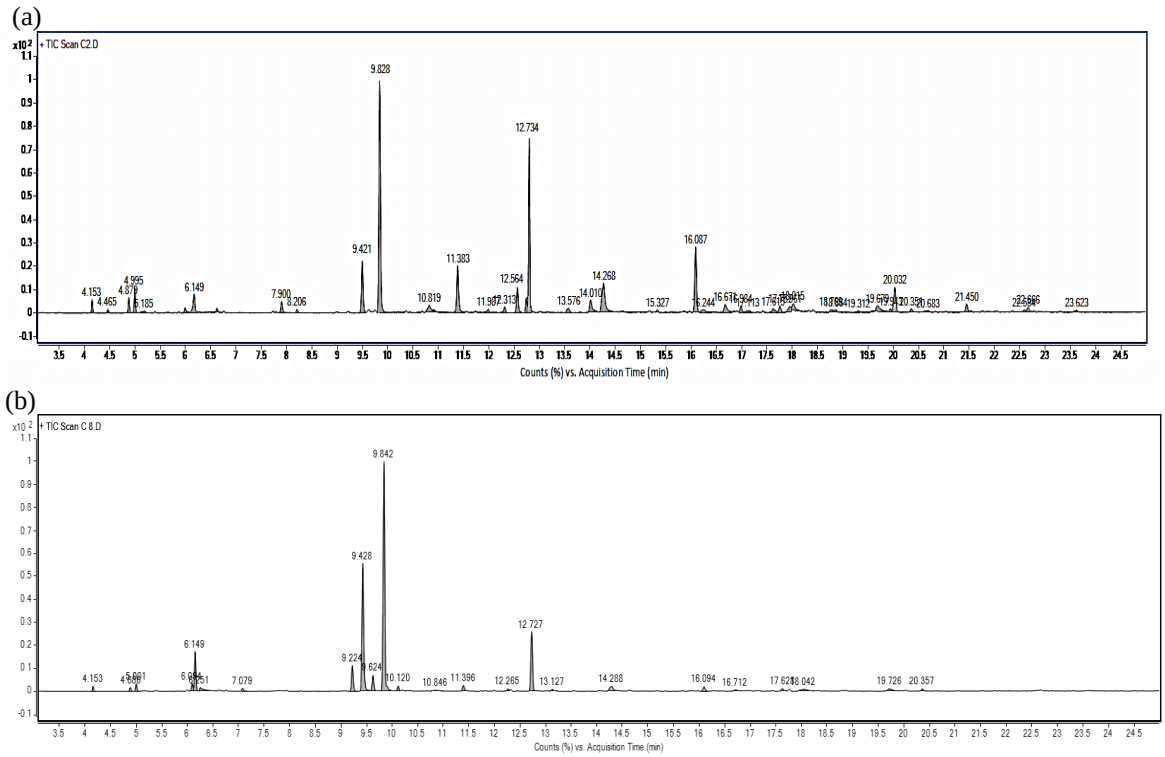
۳-۴- آنالیز اسانس

ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در جدول ۱ نشان داده شده است. براساس نتایج، ۴۳ ترکیب با استفاده از GC-Mass شناسایی شدند. مطابق نتایج حاصل، کاربرد نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید، صرف‌نظر از موارد معدودی، باعث افزایش ترکیبات اسانس شدند. به‌طورکلی، گیاهانی که تحت تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره بودند، بیشترین مقدار اسانس را داشتند. براساس نتایج حاصل، بیشترین درصد منتول (۳۹,۳۱ درصد) در تیمار ۱۵۰ mg L^{-1} TiO_2 NPs مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد (۲۴,۲۴ درصد)، افزایش ۶۲,۱۶ درصدی داشت. افزایش درصد منتول در تمام تیمارها به استثنای تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره (۲۵ درصد) در مقایسه با نمونه شاهد قابل‌توجه بود. ترکیباتی مانند ۱،۸ سینئول و منتیل استات با کاربرد نانوذره با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش چشمگیری داشتند. درصد ترکیب منتوفوران نیز در تیمارهای نانوذره کاهش چشمگیری داشته است، که نشان‌دهنده تأثیر مثبت تیمارهای نانوذره بر کیفیت و کمیت اسانس نعناع فلفلی می‌باشد. درصد ترکیبات فرعی دیگر در اسانس گیاه تحت تأثیر تیمارهای مختلف متغیر بوده است (جدول ۱). کروماتوگرام‌های طیف‌سنجی تیمارهای کنترل و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید در شکل ۲ نشان داده شده است. باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده، بهترین غلظت مورداستفاده از نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر درصد ترکیبات اسانس نعناع فلفلی

			Concentration (%)			
No	**Compound**	**RT**	**۰**	**۱۰۰**	**۱۵۰**	**۲۰۰**
۱	α-Pinene	۴,۱۵	۰,۹۳	۰,۵۵	۰,۶	۰,۹۲
۲	Sabinene	۴,۸۸	۱,۲	۰,۵۱	۰,۵۱	۰,۵۳
۳	β-Pinene	۵	۱,۹۷	۰,۸۴	۰,۹۵	
۴	O-Cymene	۵,۹۹	۰,۵۵			
۵	Limonene	۶,۰۹	۱,۳	۱,۱	۱,۰۵	
۶	۱,۸Cineol	۶,۱۵	۲,۴۱	۵,۳۵	۵,۶۵	۲,۸۷
۷	۴.۷,dimethyl,undecane	۶,۲۲	۰,۳۵	۳,۰۲	۱,۳	
۸	cis sabinene hydrate	۷,۰۷	-	۰,۹۲		
۹	۱-octen-۱-ol acetate	۷,۹۷	۱,۱۵			
۱۰	۳-octyl acetate	۸,۲	۰,۳۱			
۱۱	l-menthone	۹,۲۱	-	۳,۵	۴,۲۴	۰,۹۴
۱۲	Menthofuran	۹,۴۳	۵,۳۹	۲۷,۳۶	۲۲,۷۱	
۱۳	P-mentone	۹,۴۵	-			۰,۵۶
۱۴	Isoneomenthol	۹,۶۱	-		۲,۶	۰,۸۶
۱۵	Isomenthol	۹,۶۲	-	۲,۶۷		
۱۶	Menthol	۹,۸۴	۲۴,۲۴	۳۹,۰۳	۳۹,۳۱	۲۵
۱۷	dl-menthol	۱۰,۱۴	-	۰,۷۳	۰,۷۸	
۱۸	Cumaldehyde	۱۰,۸۲	۱,۸۹			
۱۹	۱-H-Benzimidazole-۵-methoxy	۱۰,۸۷	-			۱,۶۹
۲۰	Pulegon	۱۱,۳۹	۵,۵۹	۱,۲۲	۱,۱۹	۰,۴۵
۲۱	۲,۳,۴,trimethyl,Decane	۱۱,۹۸	۰,۴۱			
۲۲	۲,۲,۶,trimethyl,octane	۱۱,۹۹	-			۰,۲۶
۲۳	Bornyl acetate	۱۲,۵۷	۲,۶۸			
۲۴	Menthyl acetate	۱۲,۷۳	۱۵,۲۵	۷,۹۹	۱۰,۴۸	۲,۶۳
۲۵	Orcinol,monoacetate	۱۴,۰۴	۲,۰۵			
۲۶	Menthofourolactone	۱۴,۲۸	۵,۷۸	۰,۶۲	۱,۹۴	۶,۳۱
۲۷	Amol	۱۴,۶۱	-			۳,۸۶
۲۸	Furfuryl isothiocyanate	۱۵,۱۷	-			۰,۴۳
۲۹	Caryophylene	۱۶,۰۹	۷,۵۴	۱,۸۲	۰,۹۱	
۳۰	۳H-۲-۱-Benzoxathiole-۳chloro-۱-۱-dioxide	۱۶,۲۱	-			۰,۸۶
۳۱	Acetophenone,۲-hydroxy-۵-methoxy	۱۶,۲۴	۰,۶۹			
۳۲	۳-octen-۲-one-۳-butyl	۱۶,۳۷	-			۵,۶
۳۳	Cis-Trans-۱,۶-Dimethylspiro(۴.۵)decane	۱۶,۶۸				۱,۵۱
۳۴	Humulene	۱۶,۹۸	۰,۷۸			

۳۵	۳،۳-Dimethylhexane	۱۷،۱	۰،۴۵			
۳۶	Cis murrola ۴(۱۴)-diene	۱۷،۶۱	۰،۶۳			
۳۷	Germacrene D	۱۷،۶۲	-	۱،۸۸		
۳۸	hexadecane	۱۷،۷۵	۰،۸۳	۰،۴		
۳۹	Anisol	۱۷،۹۴	۱،۰۲			
۴۰	Mintfuranone	۱۸،۰۱	۱،۲۶		۱،۲۹	۹،۱۶
۴۱	۳-Ethyl-۳-methylheptane	۱۸،۸۶	۰،۳۳			
۴۲	۷-a-Hydroxymintlactone	۱۹،۶۷	۱،۴۹		۱،۱۱	۱۶،۱۳
۴۳	Caryophylene oxide	۲۰،۰۳	۳،۳			۰،۶۴



شکل ۲- کروماتوگرام طیف‌سنجی گیاه نعناع فلفلی در تیمار (a) کنترل (b) غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید

۴- بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده تأثیر مثبت نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات اسانسی گیاه نعناع فلفلی بوده است. افزایش مقدار ترکیبات فنلی در حضور نانوذرات TiO_2 احتمالاً به دلیل افزایش بیان آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها می‌باشد. به‌عنوان‌مثال، افزایش منتول احتمالاً به‌دلیل افزایش بیان آنزیم منتون ردوکتاز می‌باشد که باعث احیای

منتون به منتول می‌شود. افزایش محتوای ترکیبات موجود در اسانس‌های فرار با کاربرد نانوذرات به دلایلی مانند افزایش رشد، فتوسنتز، افزایش بیان آنزیم‌های بیوسنتزی ترپنوئیدها و افزایش تراکم غدد ترشحی مرتبط می‌باشد (Ahmad et al. ۲۰۱۸). نتایج مطالعه Moghadam و همکاران (۲۰۱۶)، رابطه مستقیم بین فتوسنتز و فرآورده‌های فتوسنتزی با تولید اسانس را در گیاهان نشان داد. به‌طوری‌که همبستگی بین فتوسنتز و تولید اسانس نشان می‌دهد که گلوکز به‌عنوان پیش‌ماده مناسب در سنتز مونوترپن‌ها عمل می‌کند (Moghaddam et al. ۲۰۱۶). افزایش ترکیبات ثانویه تحت تیمار نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید توسط سایر محققین گزارش شده است. به‌طور مثال، Golami و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که محتوا و ترکیبات اسانس گیاه رزماری تحت تیمار نانوذره TiO_2 افزایش یافته است (Golami et al. ۲۰۱۸). افزایش مقدار رزمارینیک اسید در گیاه *Dracavephalum moldavicia* تیمار شده با نانوذرات گزارش شد (Tan et al. ۲۰۱۷). همچنین Shabbir و همکاران (۲۰۱۹) تأثیر مثبت نانوذرات TiO_2 بر روی محتوا و ترکیب اصلی گیاه *zizanioides Vetiveria* به نام khusimol را گزارش کردند (Shabbir et al. ۲۰۱۹).

خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات، آن‌ها را قادر می‌سازد تا پاسخ‌های متفاوتی را در گیاهان ایجاد کنند. در مطالعه حاضر، محلول‌پاشی برگ با نانوذرات TiO_2 باعث افزایش ترکیبات فنلی و درصد ترکیبات اسانس گیاه نعناع فلفلی شده است. نتایج تحقیق حاضر، کاربرد سودمند غلظت‌های بهینه نانوذرات TiO_2 برای بهبود عملکرد و افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاهان دارویی مختلف پیشنهاد می‌کند.

منابع

- Ahmad B, Shabbir A, Jaleel H, Khan MMA, Sadiq Y. (۲۰۱۸). Efficacy of titanium dioxide nanoparticles in modulating photosynthesis, peltate glandular trichomes and essential oil production and quality in *Mentha piperita* L. Current Plant Biology ۱۳,۶-۱۵.

- Ganapathi B, Kargi F. (۱۹۹۰). Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). Journal of experimental botany, ۴۱(۳), ۲۵۹-۲۶۷.

- Gohari G, Mohammadi A, Akbari A, Panahirad S, Dadpour MR, Fotopoulos V, Kimura S. (۲۰۲۰). Titanium dioxide nanoparticles (TiO۲ NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. Scientific reports, ۱۰ (۱), ۱-۱۴.

- Golami A, Abbaspour H, Hashemi-Moghaddam H, Gerami M. (۲۰۱۸). Photocatalytic Effect of TiO_2 Nanoparticles on Essential Oil of *Rosmarinus Officinalis*. Journal of Biochemical Technology, ۹(۴), ۵۰-۵۶.

- Loolaie M, Moasefi N, Rasouli H, Adibi H. (۲۰۱۷). Peppermint and its functionality: A review. Arch Clin Microbiol, ۸(۴), ۱-۱۶.

- Marslin G, Sheeba CJ, Franklin G. (۲۰۱۷). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. Frontiers in plant science, ۸, ۱-۸.

- Moghaddam HA, Mohammadi M, Reyhani SS. (۲۰۱۶). Improved photon to current conversion in nanostructured TiO۲ dye-sensitized solar cells by incorporating cubic BaTiO۳ particles deliting incident. Solar Energy, ۱۳۲, ۱-۱۴.

- Pramila D, Xavier R, Marimuthu K, Kathiresan S, Khoo M, Senthilkumar M, Sathya K, Sreeramanan S. (۲۰۱۲). Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperita*: Lamiaceae). Journal of Medicinal Plants Research, ۶(۲), ۳۳۱-۳۳۵.

- Sauvesty A, Page F, Huot J. (۱۹۹۲). A simple method for extracting plant phenolic compounds. Canadian Journal of Forest Research, ۲۲(۵), ۶۵۴-۶۵۹.

- Seif sahandi M, Mehrafarin A, Khalighi-Sigaroodi F, Sharifi M, Naghdi badi H. (۲۰۱۸). Review on Anatomical, Phytochemical and Pharmacological Properties of Peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal of Medicinal Plants, ۱(۶۹), ۱۶-۳۳.

- Shabbir A, Khan M, Ahmad B, Sadiq Y, Jaleel H, Uddin M. (۲۰۱۹). Efficacy of TiO۲ nanoparticles in enhancing the photosynthesis, essential oil and khusimol biosynthesis in *Vetiveria zizanioides* L. Nash. PHOTOSYNTHETICA, ۵۷(۲), ۵۹۹-۶۰۶.

- Shah PP, Mello P. (۲۰۰۴). A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*.

- Singh A, Dwivedi P. (۲۰۱۸). Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. J Pharmacogn Phytochem, ۷(۱), ۷۵۰-۷۵۷.

- Singh P, Misra A. (۲۰۰۱). Influence of gibberellin and ethrel on growth chlorophyll content and enzyme activities and essential monoterpene oil in an efficient genotype of *Mentha spicata* var. MSS-۵. J Med Arom Plant Sci, ۲۲, ۲۸۳-۲۸۶.

- Tan M-e, He C-h, Jiang W, Zeng C, Yu N, Huang W, Gao Z-g, Xing J-g. (۲۰۱۷). Development of solid lipid nanoparticles containing total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. and their therapeutic effect against myocardial ischemia–reperfusion injury in rats. International journal of nanomedicine, ۱۲, ۳۲-۵۳.

- Tepe B, Sokmen A. (۲۰۰۷). Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. Natural Product Research, ۲۱(۱۳), ۱۱۳۳-۱۱۴۴.

- Tyler V, Brady L, Robbers J. (۱۹۸۸). Pharmacognosy. ۹th edit. Lea and Fabiger, Philadelphia.

- Zhang B, Zheng LP, Yi Li W, Wen Wang J. (۲۰۱۳). Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO۲ core-shell nanoparticles. Current Nanoscience, ۹(۳), ۳۶۳-۳۷۰.