تأثير مستويات مختلفة من النتروجين والرش بحامض الجبرليك في النسبة المئوية لبعض المركبات الفينولية لنبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* [+]

THE EFFECT OF VARIOUS NITROGENIC LEVELS AND SPRAYING WITH GIBBERELLIC ACID ON PERCENTAGE RATIO OF SOME PHENOLIC COMPOUNDS OF *MENTHA PIPERITA*

فنار هاشم يوسف [*] أياد جاجان الداؤدي [**] محمد داؤد الصواف [***]

المستخلص:

تبين الدراسة الحالية تأثير التسميد النتروجيني بالمستويات (صفر، ٤٦، ٩٢ أو ١٣٨) كغم/هكتار وحامض الجبرليك بالمستويات (صفر، ٥٠ أو ١٠٠) ملغم/لتر على نوعية وكمية بعض المركبات الفينولية لنبات النعناع *Mentha piperita*.

وقد أظهرت النتائج احتواء المستخلص الايثانولي لاوراق نبات النعناع على مركبات (Salicylic acid، Gallic acid، Quercetin) باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء ومقارنة النتائج باستخدام بعض المركبات القياسية للحشة الصيفية والخريفية. وقد تبين ان الحشة الخريفية تميزت على الصيفية بالنسبة المئوية لتواجد حامض الساليسيلك التي بلغت ٩٨.٧٠١٪ عند اضافة السماد النتروجيني بالمستوى ٩٢ كغم/هكتار وبدون رش بحامض الجبرليك فضلا عن مركب الكورسيتين والكاليك اذ بلغت نسبة تواجدهما ٧.٢٠٢٪ و٤١.٢٣٠٪ على التوالي بالمستوى ١٣٨ كغم/هكتار مع الرش بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/لتر.

Abstract:

The current study was carried out to investigate the effect of Nitrogen fertilization at levels (0, 46, 92 or 138) Kg/h and spraying with gibberellic acid in levels (0, 50 or 100) ppm on the quality and quantity of some phenolic compounds from *Mentha piperita*. Results showed, that the ethanol extract of Mentha leaves contained the following compounds: (Salicylic acid, Gallic acid and Quercetin) high performance liquid chromatography technique (HPLC) was used and the results were compared with some standard compounds for summer and autumn harvests. The autumn harvest recognition of salicylic acid 98.701% when the nitrogenic fertilizer was added in the level of 92 Kg/h, without spraying of gibberellic acid as well as quercetin and Gallic acid compounds about 7.202% and 41.230% respectively in the level of 138 Kg/h with spraying of gibberellic acid at concentration (100) ppm.

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠١١/٩/٢٦ ،تاريخ قبول النشر ٢٠١٢/٤/٢٣ .

[*] مدرس مساعد /كلية الزراعة والغابات /جامعة الموصل .

[**] استاذ /كلية الزراعة والغابات /جامعة الموصل .

[***] استاذ مساعد / كلية الزراعة والغابات /جامعة الموصل .

المقدمة:

يعد نبات النعناع *Mentha sp.* واحدا من أهم النباتات العطرية المعمرة، والذي ينتشر بصورة واسعة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم، والعديد من أنوع الجنس *Mentha* توصف على أنها محاصيل صناعية، إضافة إلى أنها مصدر للزيوت الأساسية الغنية بالتربينات الأحادية[1]. وهو من أهم النباتات الطبية العشبية المعمرة توجد منه أنواع مختلفة تزرع للإنتاج التجاري منها النعناع الفلفلي *Mentha piperita*، وهو ينتمي للعائلة الشفوية Lamiaceae، وهي من العوائل الكبيرة إذ تضم ما يقارب ٢٠٠ جنس و ٣٠٠٠ نوع[2]. يوجد منها في العراق ٣١ جنساً و٥٥ نوعاً[3].

وتسمى الزيوت الطيارة (Volatile oils) زيوتا عطرية (Aromatic oils) لرائحتها العطرية المميزة أو زيوتا ايثرية (Ethereal oils) لسهولة ذوبانها بالايثر، وتسمى أيضا بالزيوت الضرورية (Essential oils) وتعد ذات أهمية اقتصادية كبيرة اذ تدخل كمواد أولية في الكثير من الصناعات الصيدلانية والاقتصادية[4].

ونظرا لأهمية نبات النعناع (mint) كمصدر للزيوت الطيارة، نجد ان أنواع الجنس (Mentha) منتشرة في بعض مناطق العالم[5]. وتعد الهند في مقدمة الدول المنتجة لزيت النعناع في العالم، يليها الصين والبرازيل، إذ تصدر الهند زيت النعناع إلى العديد من دول العالم منها الولايات المتحدة الأمريكية واليابان وألمانيا والبرازيل، وبلغ ما تنتجه الهند للعام ٢٠٠٩ (٣٨) ألف طن من زيت النعناع وما تنتجه من المنثول (٥٥) ألف طن[6]. ويزرع النعناع في الخريف أو الربيع ويتطلب رطوبة مستمرة في الأرض ويمكن حصاده (٣-٤) مرات في السنة، ويتم تبديل الارض والاحواض كل ثلاث سنوات لتفادي تدني نسبة المواد الفعالة فيه وفقدانها لمفعولها[7]. لقد وجد ان الزيوت الطيارة لنبات النعناع تتأثر بالعديد من العوامل منها العامل الوراثي، اضافة إلى ان لمرحلة النمو وموعد الحش وعدد مراته فضلا عن تأثير العامل البيئي تعتبر من العوامل المؤثرة في نوعية وكمية الزيوت الطيارة بالإضافة إلى الحاصل الأخضر[8].

لقد شخصت العديد من المركبات الفينولية لأنواع مختلفة من النعناع منها الفلفلي *Mentha piperita* في الأوراق والأزهار والسيقان واعتبرت كمضادات أكسدة طبيعية وعزلت أيضا الكلايكوسيدات الحرة للنعناع بعملية التحلل الحامضي[9]. أما بصدد تأثير التسميد النتروجيني والرش بحامض الجبرليك على نوعية وكمية المواد الفينولية فان الدراسات في هذا المجال قليلة جدا أو تكاد تكون معدومة واقتصرت فقط على تشخيص المركبات الفلافينويدية ذات الاهمية الطبية كمضادات للاكسدة والسرطان والالتهابات. ولقد وجد ان النباتات الطبية والعطرية تستجيب للجبرلينات التي تعمل على سرعة نموها الخضري وزيادة محتواها الزيتي ومركباتها التربينية، إذ وجد ان معاملة نباتات النعناع بالجبرليك يؤدي إلى كبر حجم النمو الخضري وارتفاع معدل الزيت العطري[10،11].

ولقد حظيت المركبات الفينولية ومصادرها الطبيعية بالقدر الأكبر من الاهتمام وذلك بسبب الدور الذي تلعبه فينولات النبات في معالجة العديد من الامراض إذ اشير إلى فصل مركب Luteolin وكذلك Apgenin من المجموع الخضري للنعناع الفلفلي *Mentha piperita*[12]. أما حامض الساليسيلك فقد عرف بقدرته على تخفيف الأوجاع والآلام واختزال الحمى وعلاجا للالتهابات وتستخدم مشتقاته كالمركب (P-Hydroxy benzoic acid) في علاج داء النقرس، وان الاستخدام الشائع له هو في تصنيع الاسبرين مع (Acetic Anhydride)[13]. أما مركب الـ Quercetin فانه يعيق الخلايا السرطانية وذلك من خلال الحماية التي يعطيها هذا المركب ضد المسببات السرطانية Carcinogenic اضافة لذلك فانه يلعب دورا كبيرا في علاج الأمراض القلبية[14،15]. ويتميز حامض الكاليك بأن لديه صفة مهمة جداً كمضاد للفطريات والفيروسات وهو يعمل أيضا كمضاد للأكسدة ويساعد في حماية الكثير من الخلايا ضد مخاطر الأكسدة الحيوية وكذلك وجد انه مضاد للخلايا السرطانية بدون التأثير على الخلايا السليمة لجسم الانسان[16]. ومن هنا جاءت هذه

الدراسة لبيان دور التسميد النتروجيني وحامض الجبرليك في كمية بعض المركبات الفينولية وامكانية مدى الاستفادة منها طبياً ومعرفة كميتها في الجزء النباتي بالاستفادة من تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء HPLC.

المواد وطرائق العمل:

موقع اجراء الدراسة

نفذت هذه التجربة في الحقل التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق / كلية الزراعة والغابات في جامعة الموصل في محافظة نينوى الواقعة على خطي طول ٤٣° شرقا ودائرة عرض ٣٦° شمالا وارتفاع عن مستوى سطح البحر ٢٢٣ متر للمدة من أوائل شباط ٢٠٠٩ لغاية نهاية تشرين الثاني ٢٠٠٩.

تهيئة الحقل وموعد الزراعة

زرعت نباتات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* (الشكل ١) وبعدد (١٤٤) نبات في تجربة حقلية في ٢١ ايار للعام ٢٠٠٩، داخل أحواض وبمساحة ٣.٧٥ م^2 لكل حوض، أبعاده (١.٥×٢.٥)م وقد تمت زراعة شتلات النعناع الفلفلي في الحقل بتاريخ ٢١ أيار ٢٠٠٩ بطول ١٥ سم وتم اعتماد التوزيع العشوائي لمعاملات التجربة وبواقع معاملتين في كل حوض إذ تتضمن كل معاملة ست مشاهدات بحيث يحوي كل حوض على ١٢ نبات بواقع أربعة أحواض لكل مكرر من المكررات الثلاث أي ٤٨ نبات للمكرر الواحد. علما ان الاحواض والمكررات منفصلة عن بعضها بممرات عرضها نصف متر وان شتلات المعاملة الواحدة تنتظم في صف واحد تبعد الاولى والسادسة مسافة ١٢.٥ سم عن كتف الحوض وباستخدام نظام الري بالتنقيط. أخذت نماذج من عينات التربة المراد الزراعة فيها قبل الزراعة لغرض تحليلها من حيث الصفات الفيزيائية والكيميائية وكما مبين في (الجدول ١)، وتم تشخيص هذا النوع من قبل الدكتورة عذية ناهي سليمان المشهداني/ استاذة تصنيف النبات في كلية التربية بجامعة بغداد.

معاملات التسميد والرش بحامض الجبرليك

تضمنت الدراسة تسميد نباتات النعناع الفلفلي بأربعة مستويات من السماد النتروجيني إذ أضيف السماد بالمستويات (N_0: صفر، N_1: ٤٦، N_2: ٩٢، N_3: ١٣٨) كغم/هكتار إلى تربة الحقل عشوائيا على شكل يوريا (٤٦٪ نتروجين) إذ تم إذابة كل من الكميات المذكورة في ٧ لتر ماء/ حوض وإضافتها للمرة الأولى بعد انقضاء شهر من تاريخ زراعة الشتلات (٢١ أيار ٢٠٠٩) وبعد شهر من تاريخ الحشة الصيفية للمرة الثانية.

تم تسميد جميع الأحواض بكمية ثابتة من سوبر فوسفات ثلاثي P_2O_5 (٤٦-٤٨)٪ وسلفات البوتاسيوم K_2So_4 (٤٨-٥٢)٪ وبالمستوى ١٨.٧٥ غم/حوض لكل منها نثرا على التربة قبل زراعة الشتلات في الحقل بشهر (٢١ نيسان ٢٠٠٩) اعتماداً على ما جاء به[18،17]. استخدم تصميم القطاعات العشوائية الكاملة RCBD (تجربة عاملية في القطع المنشقة) إذ وزع التسميد عشوائيا بمستوياته الأربعة داخل القطع الرئيسية Main-plot وكذلك تم التوزيع العشوائي للمعاملات ومستويات حامض الجبرليك داخل القطع المنشقة ومثلت القطع الثانوية Subplots وكذلك اعتبرت مواعيد الحش الصيفية والخريفية قطعاً منشقة منشقة بالزمان. تم الحصول على معدل درجات الحرارة العظمى والصغرى والرطوبة النسبية ومعدل سطوع الشمس وكمية الامطار للعامين (٢٠٠٩-٢٠١٠) المبينة في (الجدول ١).

الجدول (١) درجات الحرارة العظمى والصغرى والرطوبة النسبية ومعدل سطوع الشمس والأمطار للحقل التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق للعام ٢٠٠٩*

الأشهر	العام الأول ٢٠٠٩

	معدل درجات الحرارة مْ		معدل الرطوبة النسبية ٪	معدل سطوع الشمس ساعة/يوم	كمية الأمطار (ملم)
	الصغرى	العظمى			
كانون الثاني	-٠.٠١	١٤.٣٠	٦٨	١.٠٣	٠.٠٠١
شباط	٥.٦٠	١٧.٦٠	٦٣	١٠.٤٨	٢٤.٩٠
آذار	٨.٥٠	١٩.٧٠	٦٠	١١.٢٠	٢٨.١٠
نيسان	١١.٧٠	٢٥.٨٠	٥٢	١٢.٢٥	٣٥.٧٠
أيار	١٨.٢٠	٣٤.٢٠	٣٧	١٢.٥٨	--
حزيران	٢٣.٦٠	٤٠.٣٠	٢٦	١٤.٢٨	--
تموز	٢٦.٢٠	٤٢.٢٠	٢٧	١٣.١٧	--
آب	٢٣.٧٠	٤١.٤٠	٢٩	١٣.٢٠	--
أيلول	٢١.٦٠	٣٤.٤٠	٣٤	١٢.١٣	١.٥٠
تشرين الأول	١٥.٠٠	٣٢.٣٠	٤٣	١١.١٧	١٣.٣٠
تشرين الثاني	٨.٥٠	٢٢.٥٠	٥٢	١٠.١٣	٣١.٢٠
كانون الأول	٢.٦٠	١٧.٠٠	٦٣	٩.٤٥	٧٦.٥٠

* أخذت المعلومات من الهيئة العامة للأنواء الجوية والرصد الزلزالي/ دائرة أنواء الموصل.

الشكل (١) الوصف المورفولوجي لنبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita*

الجدول (٢) صفات التربة الفيزيائية والكيميائية المستعملة في البحث

الصفات	القيم
نسجة التربة ٪ بطريقة المكشاف	رملية طينية لومية
المادة العضوية بطريقة الحرق بيروكسيد الهيدروجين (غم.كغم$^{-1}$)	١.٠٤ ٪
رقم تفاعل التربة PH من عجينة التربة المشبعة	٧.٧ ٪
التوصيل الكهربائي EC (ديسيمنز. م$^{-1}$)	٠.١٨٠
النتروجين الكلي ٪ بطريقة ماكروكلدال (ملغم. كغم$^{-1}$)	٠.٠٦٣
الفسفور الجاهز بطريقة Olsen (ملغم. كغم$^{-1}$)	١٤.٣٢
البوتاسيوم الجاهز بطريقة Flam photometer (ملغم. كغم$^{-1}$)	٣٢١
٪ الطين	٢١.٠٥
٪ الغرين	١٤.٦٥
٪ الرمل	٦٤.٣

وتم رش النباتات بتركيزين من حامض الـ GA_3 (g_1: ٥٠، g_2: ١٠٠) ملغم/لتر بعد تحضيره على شكل محلول مائي، فضلا عن استخدام معاملة المقارنة (بدون رش)، إذ رشت النباتات حتى البلل الكامل بعد شهر من زراعة الشتلات للمرة الأولى في الحقل ثم دوريا بعد شهر من تاريخ حصاد نباتات الحشة الصيفية وبنفس مواعيد إضافة السماد النتروجيني[19].

عملية حش النبات

تم حش نباتات الحقل بواقع حشتين موسمية هي الصيفية بتاريخ ١٥ آب والخريفية بتاريخ ١٥ تشرين الثاني للعام ٢٠٠٩، وبعد الحصاد وضعت في أكياس ورقية لغرض التجفيف لمدة (٧–١٥) يوم مع التقليب المستمر في الظل، إذ فصلت الاوراق عن السيقان بعد التجفيف الكامل لها وطحنت بمطحنة كهربائية محلية الصنع ثم حفظت العينات في قناني غامقة لحين اجراء عملية الاستخلاص[20].

استخلاص بعض المركبات الفينولية في نبات النعناع

تم استخدام جهاز الاستخلاص المستمر (Soxhlet) لغرض الاستخلاص وذلك باتباع الطريقة التي ذكرها[21] إذ نقعت العينات في الجهاز لمدة ٢٤–٤٨ ساعة باستخدام مذيب الايثر البترولي (٦٠–٨٠)م° وبنسبة ١٠ غم/١٠٠مل وذلك لازالة الدهون (defatted)، ثم بعد ذلك تم استخلاص نفس العينات باستخدام الايثانول المطلق ٩٩.٨٪ لمدة ٤٨ ساعة في جهاز Soxhlet. ثم ركز المحلول باستخدام المبخر الدوار إلى ما يقارب ٢٠ مل واجريت عملية التحلل الحامضي لهذه العينات باستخدام مادة خلات الاثيل، إذ أوخذت طبقة خلات الاثيل العليا وبواسطة قمع الفصل وحفظت بالثلاجة لغرض اجراء فصل وتشخيص هذه العينات باستخدام جهاز (HPLC).

اعتمدت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) في تشخيص بعض المواد الفينولية في مستخلص النعناع نوع Shimadzo, Lc.2010 وباستخدام طول موجي (320nm) وسرعة الجريان 1mL/min والعمود C18(240×4.60mm) والطور المتحرك 15%H_2O + 85%Acetonatril ودرجة حرارة الفصل 40C° وكما موضح في (الجدول ٣).

الجدول (٣) ظروف الفصل لكروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC للمركبات الفينولية في أوراق نبات النعناع *Mentha piperita*.

العمود	C 18 (٤.٦٠×٢٤٠ ملم)
الطور المتحرك	٨٥٪ أسيتون + ١٥٪ ماء
سرعة جريان الطور المتحرك	١ مل/دقيقة
حجم الخلية	٢ مل
نوع الكاشف	UV-Vis
درجة حرارة الفصل	٤٠ °م

إذ تم قياس قيم زمن الاحتجاز (R_t) للمركبات القياسية ومطابقتها مع قيم زمن الاحتجاز للعينات المقاسة، وكذلك نسب تواجد هذه المركبات الفينولية في العينات ومقارنتها مع المركبات القياسية لها (الجدول ٤).

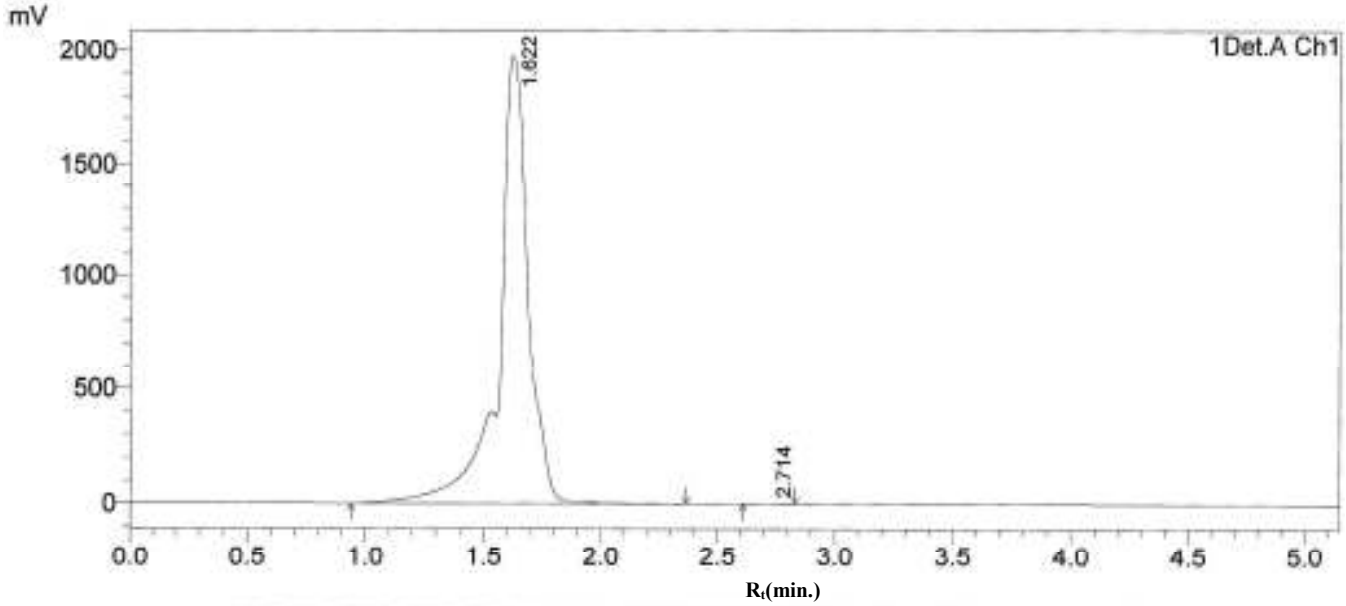
النتائج والمناقشة:

شخصت المركبات الفينولية من خلال استعمال جهاز (HPLC) بالاعتماد على قيم زمن الاحتجاز (R_t) لهذه المركبات ومقارنتها مع قيم زمن الاحتجاز للمركبات القياسية، وقد شخصت في هذه الدراسة عدد من المركبات الفينولية والنسب المئوية لتواجدها في كلا الحشتين باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC للنباتات المعاملة بالسماد النتروجيني بمستوياته المختلفة والرش بحامض الجبرليك فضلا عن استخدام نباتات المقارنة.

ويوضح (الجدول ٤) ان الحشة الصيفية تميزت بظهور حامض الساليسيلك Salicylic acid وكذلك حامض الكاليك Gallic acid ومركب الكورسيتين Quercetin في أغلب المعاملات بعد مقارنة زمن احتجاز العينات مع زمن الاحتجاز (R_t) لهذه المركبات القياسية (الشكل ٢، ٣، ٤)، إذ يظهر تأثير التسميد والرش بحامض الجبرليك وبصورة واضحة في المستوى الثاني من التسميد (٤٦ كغم/هكتار) والمعاملة بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/لتر والتي أعطت أعلى نسبة مئوية لتواجد حامض الساليسيلك والتي بلغت ٧٠.٧٠١٪ مقارنة مع عدم الرش وبالمستوى الثاني من التسميد النتروجيني والتي أعطت نسبة مئوية بلغت ٦٣.٣٥٢٪ ومقارنتها أيضا مع مستوى التسميد الثالث والرابع والتي أدت فيها معاملات الرش بحامض الجبرليك سواءا بالتركيز ٥٠ أو ١٠٠ ملغم/لتر إلى قلة النسبة المئوية لتواجد حامض الساليسيلك مقارنة مع مستوى التسميد الثاني. أما بالنسبة لحامض الكاليك فقد أعطت جميع مستويات التسميد والرش بحامض الجبرليك أقل نسبة مئوية لتواجده مقارنة مع المركب الأول، وتميزت معاملة الرش بحامض الجبرليك تركيز ٥٠ ملغم/لتر للنباتات غير المسمدة باعطاء أعلى نسبة مئوية لتواجد المركب بلغت ١.٦٧٨٪ مقارنة مع باقي مستويات التسميد الأخرى ومعاملات الرش، في حين أعطى مركب Quercetin أعلى نسبة مئوية لتواجده في المستوى الرابع من التسميد (١٣٨ كغم/هكتار) مع الرش بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/ لتر بلغت ٦.٢٢٣٪ مقارنة مع باقي مستويات التسميد ومعاملات الرش (الشكل ٥، ٦، ٧).

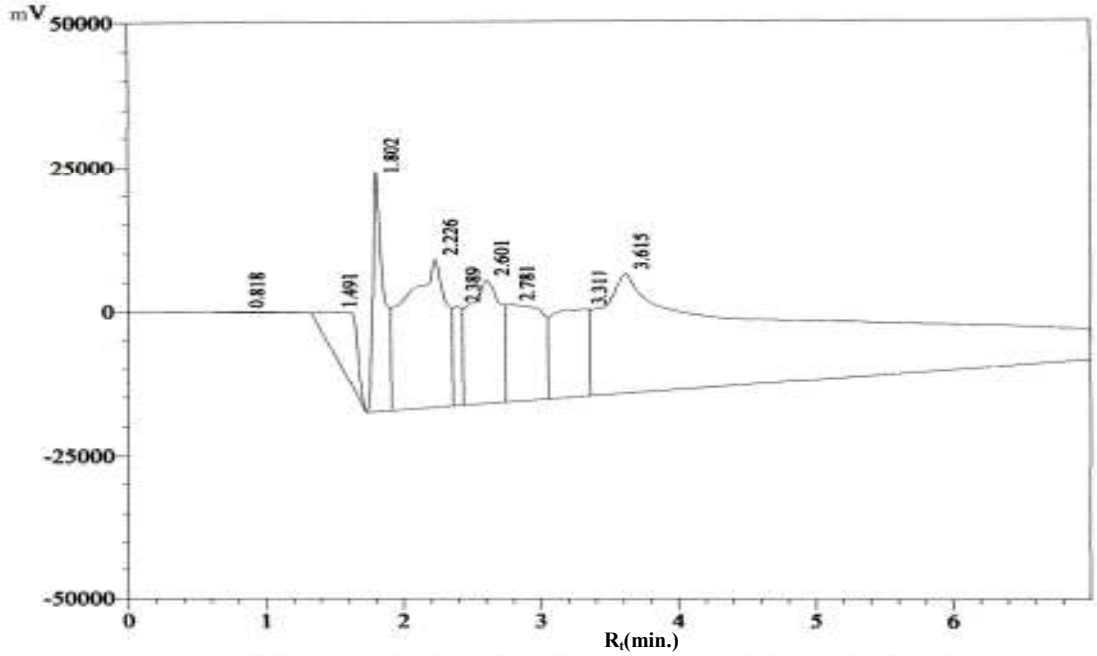
الجدول (٤) تأثير مستويات مختلفة من النتروجين والرش بحامض الجبرليك في النسبة المئوية لبعض المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي لنبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* باستخدام جهاز HPLC للحشة الصيفية

Gallic acid		Quercetin		Salicylic acid		Phenolic Compounds	
2.43 min.		3.61 min.		1.622 min.		Standard R_t min	
R_t min.	Area%	R_t min.	Area%	R_t min.	Area%	معاملات الرش ملغم.لتر$^{-1}$	مستويات النتروجين غم/م^{2}
٢.٤٥	٠.٤٢١	**	**	١.٥٨	٩٧.٩٨٥	بدون رش	N_0 صفر
٢.٤٤	١.٦٧٨	٣.١٤	٠.٢٧١	١.٦٨	٤٢.٩٢٤	جبرلين ٥٠	
٢.٤٢	٠.٧٩١	٣.٧١	٠.٣٦٠	١.٦٧	٦٣.٣٥٢	بدون رش	N_1 ١٧.٢٥
٢.٢٥	٠.٣٦٤	٣.٧٢	١.٢٩٦	١.٦٠	٧٠.٧٠١	جبرلين ١٠٠	
٢.٤٠	٠.٠٣٥	٣.٥٧	١.٧٣٧	١.٥٨	٣٩.٧٨٧	بدون رش	N_2 ٣٤.٥٠
٢.٣٩	٠.٠٩٤	٣.٧٣	٠.١٠٠	١.٥٩	٥٦.٠٢٦	جبرلين ٥٠	
٢.٤٥	٠.١٠٧	**	**	١.٥٨	٥٥.٩٣٠	بدون رش	N_3 ٥١.٧٥
٢.٣٢	١.٢١٣	٣.٦٢	٦.٢٢٣	١.٦٢	٦٨.٦٢٠	جبرلين ١٠٠	



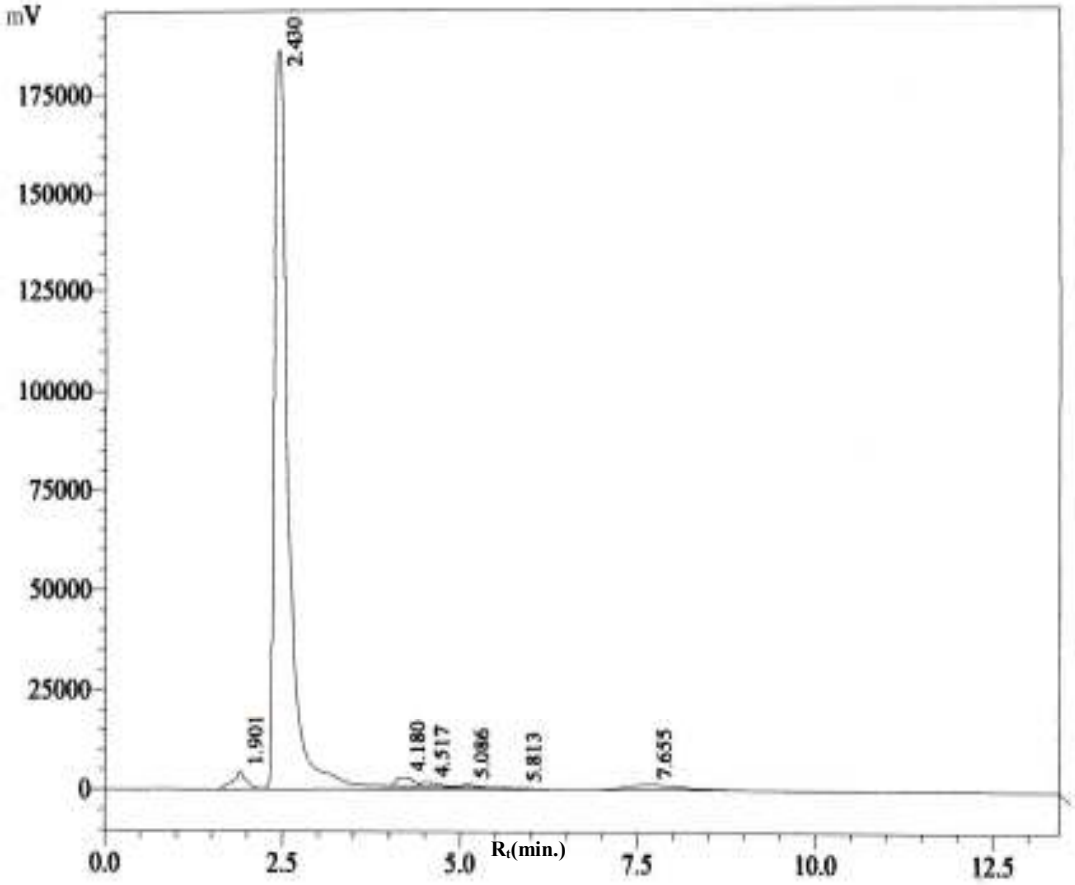
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.622	17024440	1976954	99.985	99.974
2	2.714	2621	507	0.015	0.026
Total		17027062	1977461	100.000	100.000

الشكل (٢) المنحنى القياسي لحامض الساليسيلك المشخص باستخدام جهاز HPLC



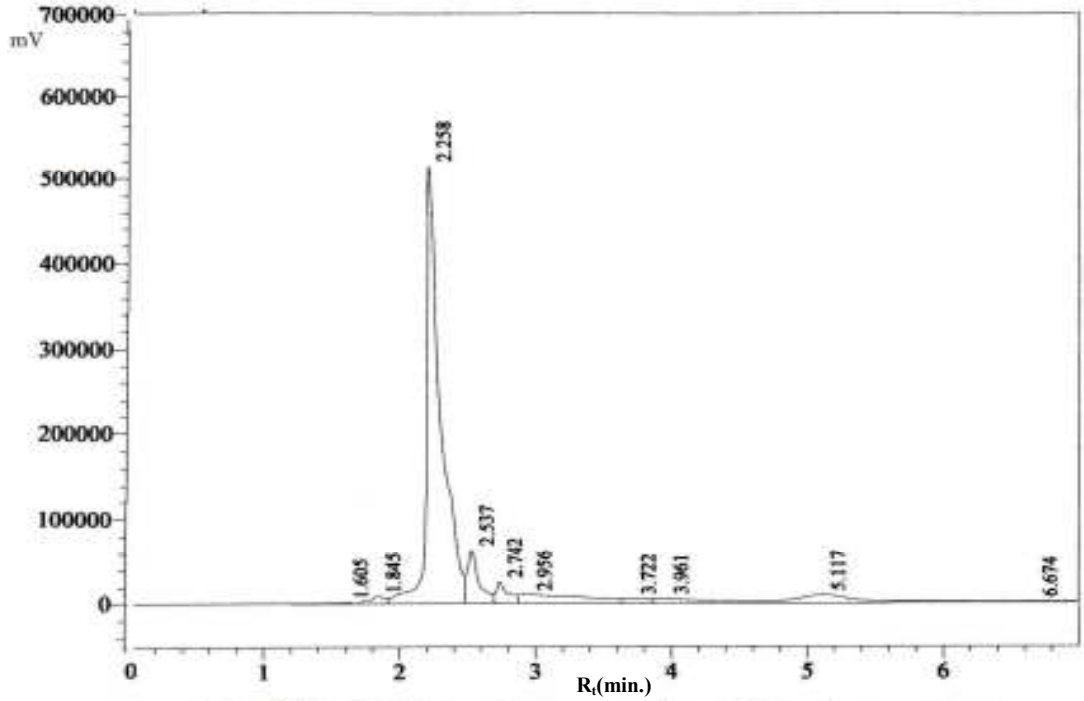
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	0.818	3280	115	0.071
2	1.491	149825	7017	3.238
3	1.802	229451	41696	4.959
4	2.226	548050	25683	11.845
5	2.389	75433	17272	1.630
6	2.601	350425	21571	7.574
7	2.781	297699	16909	6.434
8	3.311	277460	15236	5.997
9	3.615	2434066	20846	52.609
10	7.763	173057	4086	3.740
11	8.655	55852	1860	1.207
12	8.913	9171	1246	0.198
13	9.134	16387	1026	0.354
14	10.134	3136	125	0.068
15	11.498	3376	136	0.073
Total		4626670	174825	100.000

الشكل (٣) المنحنى القياسي لمركب الكورسيتين المشخص باستخدام جهاز HPLC



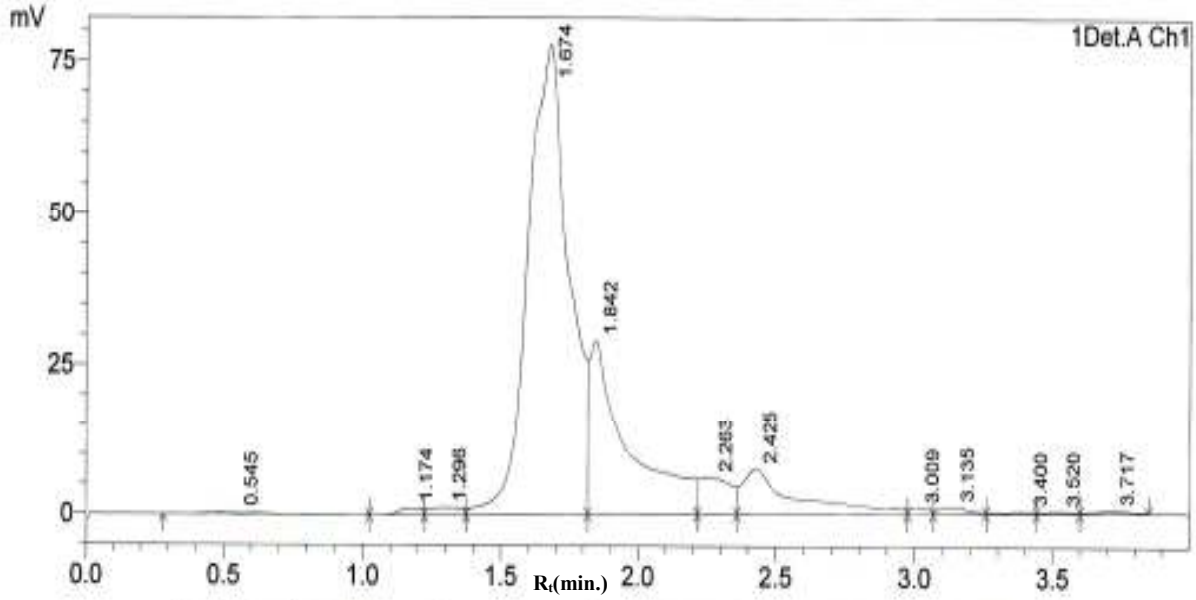
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	1.901	56366	4525	2.017
2	2.430	2610494	185705	93.392
3	4.180	34556	2163	1.236
4	4.517	18065	1005	0.646
5	5.086	9950	570	0.356
6	5.813	1109	56	0.040
7	7.655	64664	1183	2.313
Total		2795204	195207	100.000

الشكل (٤) المنحنى القياسي لحامض الكاليك المشخص باستخدام جهاز HPLC



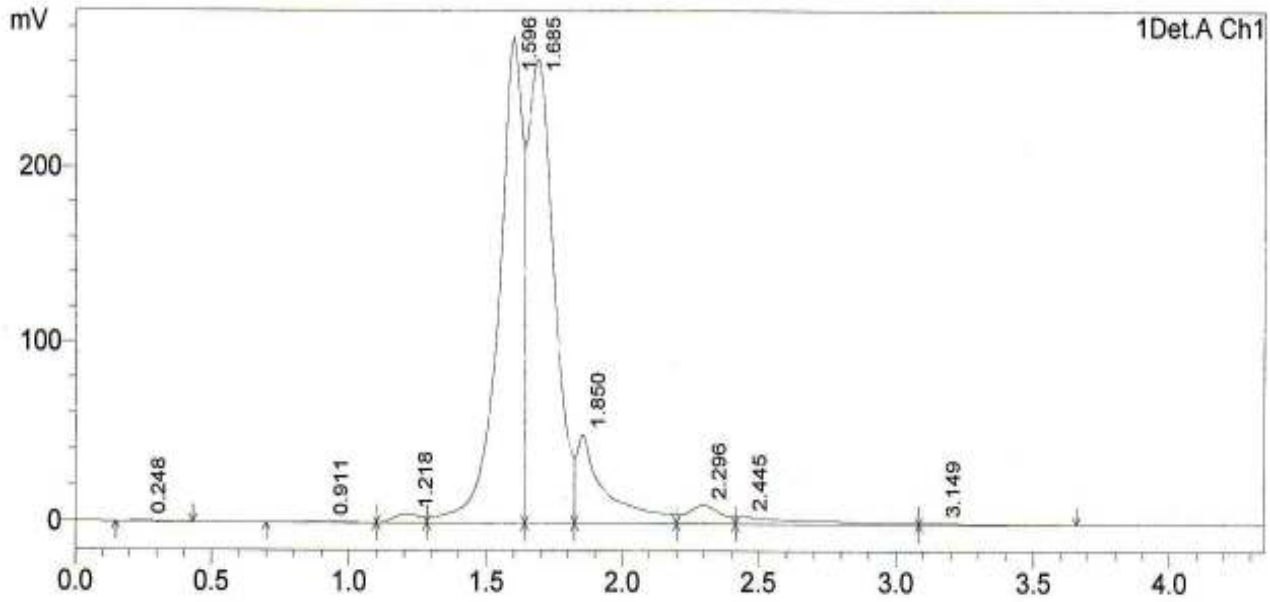
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	1.605	19266	2067	70.701
2	1.845	68325	8727	1.290
3	2.258	3744351	510363	0.364
4	2.537	385950	63253	7.287
5	2.742	156066	26129	2.947
6	2.956	343048	10222	6.477
7	3.722	68657	5565	1.296
8	3.961	151379	5401	2.858
9	5.117	301981	9001	5.702
10	6.674	14386	787	0.272
11	7.111	18104	749	0.342
12	7.355	8284	605	0.156
13	7.659	12016	551	0.227
14	8.322	4248	191	0.080
Total		5296062	643710	100.000

الشكل (٥) منحنى المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي عند الرش بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/لتر بالمستوى الثاني من التسميد



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.545	5143	328	0.399	0.260
2	1.174	6817	1099	0.529	0.872
3	1.296	10101	1190	0.784	0.944
4	1.674	816390	77815	63.352	61.707
5	1.842	279210	29053	21.667	23.039
6	2.263	46980	6025	3.646	4.777
7	2.425	100397	7464	7.791	5.919
8	3.009	4626	891	0.359	0.706
9	3.135	8660	1183	0.672	0.938
10	3.400	3020	273	0.234	0.217
11	3.520	2681	332	0.208	0.263
12	3.717	4634	451	0.360	0.358
Total		1288658	126104	100.000	100.000

الشكل (٦) منحنى المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي لمعاملة المقارنة (بدون رش) وبالمستوى الثاني من التسميد



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.248	2319	268	0.058	0.044
2	0.911	5594	524	0.140	0.086
3	1.218	31526	4606	0.792	0.760
4	1.596	1710216	274783	42.945	45.330
5	1.685	1709373	262404	42.924	43.288
6	1.850	358076	49155	8.992	8.109
7	2.296	87624	10058	2.200	1.659
8	2.445	66815	3739	1.678	0.617
9	3.149	10798	642	0.271	0.106
Total		3982340	606178	100.000	100.000

الشكل (٧) منحنى المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي عند الرش بحامض الجبرليك تركيز ٥٠ ملغم/لتر وبدون تسميد

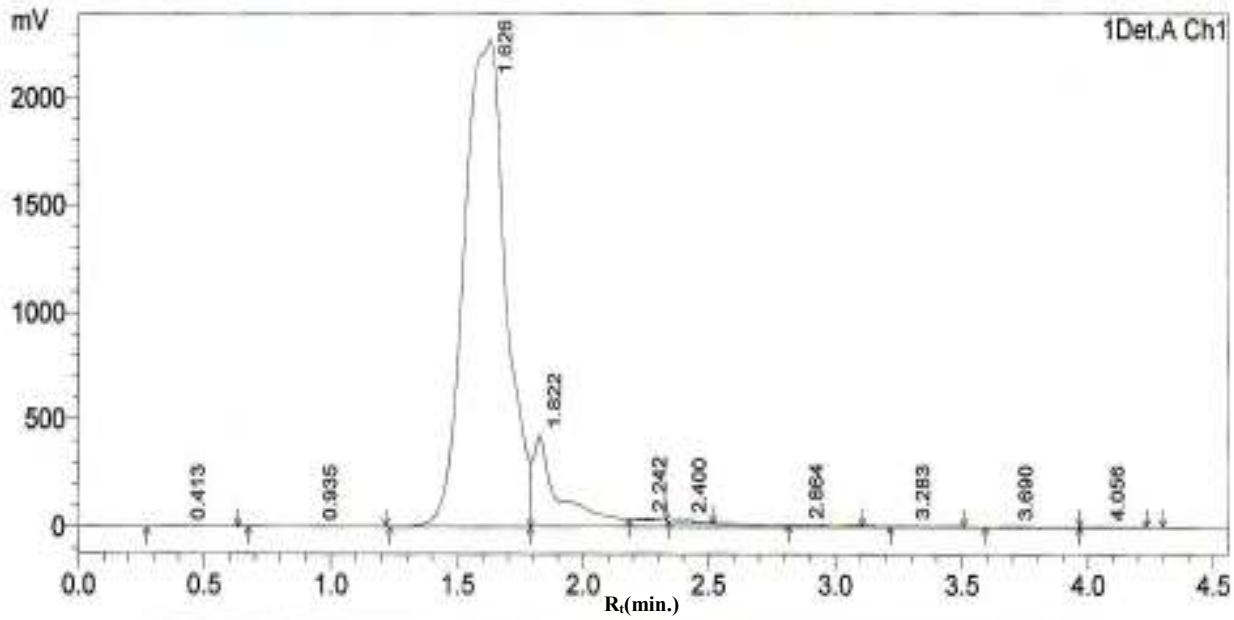
أما الحشة الخريفية فتوضح قياسات كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC (الجدول ٥)، بأن معاملات المقارنة (بدون رش) لنباتات المستوى الأول والثالث والرابع للتسميد النتروجيني أعطت أعلى نسبة مئوية لتواجد حامض الساليسيلك بلغت (٩٧.٩٧٣، ٩٨.٧٠١، ٨٦.٣٧٠) على التوالي بينما يلاحظ في المستوى الثاني من التسميد (٤٦ كغم/هكتار) ان الرش بحامض الجبرليك بتركيز ١٠٠ ملغم/لتر زاد من النسبة المئوية لتواجد هذا المركب إذ بلغت ٨٦.١٠١٪ (الشكل ٨). أما بالنسبة لحامض الكاليك فقد تم الحصول على أعلى نسبة مئوية لتواجده والتي بلغت ٤١.٢٣٠٪ في النباتات المسمدة بالمستوى الرابع (١٣٨ كغم/هكتار) والمعاملة بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/لتر (الشكل ٩). يليها المعاملة التي تم فيها رش النباتات بحامض الجبرليك تركيز ٥٠ ملغم/لتر ضمن المستوى الأول من التسميد إذ بلغت النسبة المئوية لتواجده ٩.٥١٩٪ (الشكل ١٠). وأدى الرش بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/لتر مع استخدام التسميد بالمستوى الرابع (١٣٨ كغم/هكتار) إلى الحصول على أعلى نسبة مئوية لتواجد مركب Quercetin بلغت ٧.٢٠٢٪ (الشكل ٩) في حين قلت هذه النسبة في النباتات الغير مسمدة والمعاملة بحامض الجبرليك تركيز ٥٠ ملغم/لتر إذ بلغت ١.٨٢٠٪ (الشكل ١٠)، يليها المعاملة التي رشت فيها النباتات بحامض الجبرليك تركيز ٥٠ ملغم/لتر ضمن

المستوى الثالث للتسميد (٩٢ كغم/هكتار) إذ بلغت النسبة المئوية لتواجد المركب ١.٨٩٤٪ مقارنة مع نباتات المقارنة التي أعطت نسبة تواجد ٠.٧٦٢٪ فقط (الشكل ١١، ١٢) على التوالي.

ان هذه الاختلافات في محتوى الأوراق من المركبات الفينولية المدروسة ربما يعود إلى الاختلافات في المسارات الأيضية كنتيجة لتأثر النباتات بالظروف البيئية كالضوء ودرجة الحرارة والحالة التغذوية للنبات كاضافة الاسمدة، فقد وجد[22] ان التسميد النتروجيني لنبات الريحان يؤثر تأثيرا كبيرا على المحتوى الكلي للفينولات في الصنف Dark Opal و Genovese عند استخدامه بالمستوى الواطئ، وكذلك تم الحصول على اعلى النسب المئوية لحامض Rosmarinic و Gaffeic عند استخدام المستوى الواطئ ايضا، فضلا عن ذلك فان التسميد النتروجيني يؤثر على استخدام المركبات الفينولية للريحان كمضادات للاكسدة عند معاملته بالمستوى العالي الذي يثبط هذه الصفة، بينما وجد ان مركبات فلافينويدية أخرى كالانثوسيانينات لم تتأثر باضافة السماد النتروجيني وانما تأثرت بفصل النمو وموعد الحصاد. واجمالا يمكن القول ان الحشة الخريفية تميزت عن الحشة الصيفية بارتفاع نسب كل من مركبات حامض الساليسيلك والكورسيتين فضلا عن حامض الكاليك وبالنسب (٩٨.٧٠١، ٧.٢٠٢، ٤١.٢٣)٪ على التوالي. وقد يعزى ذلك إلى الظروف البيئية (الجدول ١) خلال فترة النمو للحشة الخريفية وهذا يتفق مع ما ذكره[23] من ان اضافة التسميد النتروجيني يكون مفضلا عن اعتدال درجة الحرارة وفترة الاضاءة القصيرة. وان موسم النمو الطويل للبلدان ذات المناخ الحار مع حصاد الريحان ٣–٥ حصدات متتابعة بالسنة يتطلب استخدام كميات اضافية بعد الحصاد لتشجيع النمو[24]. أما فعل حامض الجبرليك فانه يعمل على تشجيع وتخليق الفينولات الثنائية في النباتات التي تعمل بدورها على وقف الانزيمات المؤكسدة للاوكسينات الداخلية في انسجة الاعضاء النباتية من خلال فعل حامض الجبرليك في تشجيع انتاج انزيم α-amylase الذي يحول النشأ إلى سكر الكلوكوز داخل الخلية وهذا بدوره يسلك مساران لانتاج الفينولات وهي Shikimic acid pathway و Acetate pathway [25، 10]. إذ تم فصل وتشخيص مركب الكورسيتين في هذه الدراسة لنبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* على الرغم من قلة الدراسات في هذا المجال التي تتناول فصل وتشخيص هذا المركب للنوع الفلفلي واقتصر الحديث فقط على تواجده في نبات النعناع البري *Mentha longifolia*[26].

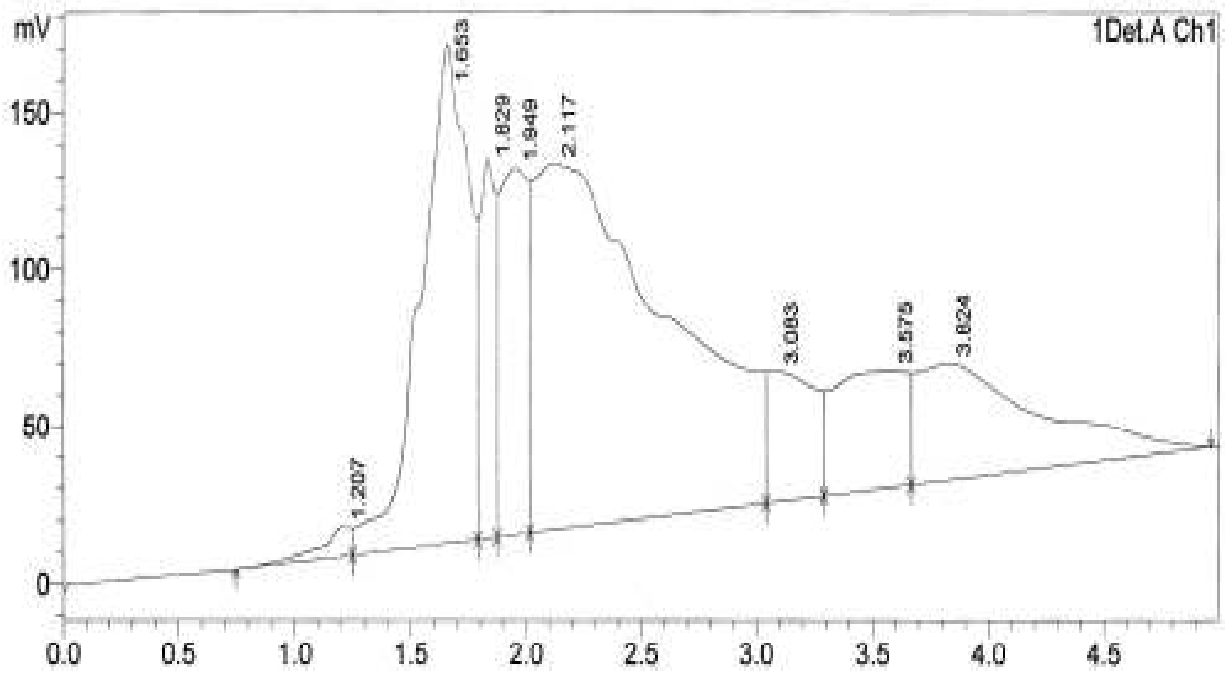
الجدول (٥) تأثير مستويات مختلفة من النتروجين والرش بحامض الجبرليك في النسبة المئوية لبعض المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي لنبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* باستخدام جهاز HPLC للحشة الخريفية

Gallic acid		Quercetin		Salicylic acid		Phenolic Compounds	
2.43 min.		3.61 min.		1.622 min.		Standard R_t min	
R_t min.	Area%	R_t min.	Area%	R_t min.	Area%	معاملات الرش ملغم.لتر$^{-1}$	مستويات النتروجين غم/م^2
٢.٤١	١.١٤٧	**	**	١.٦٢	٩٧.٩٧٣	بدون رش	N_0 صفر
٢.٤٢	٩.٥١٩	٣.٧٥	١.٨٢٠	١.٦٤	٥٩.٥٩٠	جبرلين ٥٠	
٢.٤٢	٥.٩١٩	٣.٧١	٠.٣٥٨	١.٦٧	٦١.٧٠٧	بدون رش	N_1 ١٧.٢٥
٢.٤٠	٠.١٦٧	٣.٦٩	٠.٠٠٤	١.٦٢	٨٦.١٠١	جبرلين ١٠٠	
٢.٢١	٠.٠٧٦	٣.٦٦	٠.٧٦٢	١.٦١	٩٨.٧٠١	بدون رش	N_2 ٣٤.٥٠
٢.٤٢	٩.٤٧٧	٣.٧٤	١.٨٩٤	١.٦٣	٦٧.٩٩٦	جبرلين ٥٠	
٢.٣٦	٨.٩٤٧	٣.٧٠	٠.٦٠٠	١.٦٧	٨٦.٣٧٠	بدون رش	N_3 ٥١.٧٥
٢.١١	٤١.٢٣٠	٣.٥٧	٧.٢٠٢	١.٦٥	٢٠.٢٨٤	جبرلين ١٠٠	



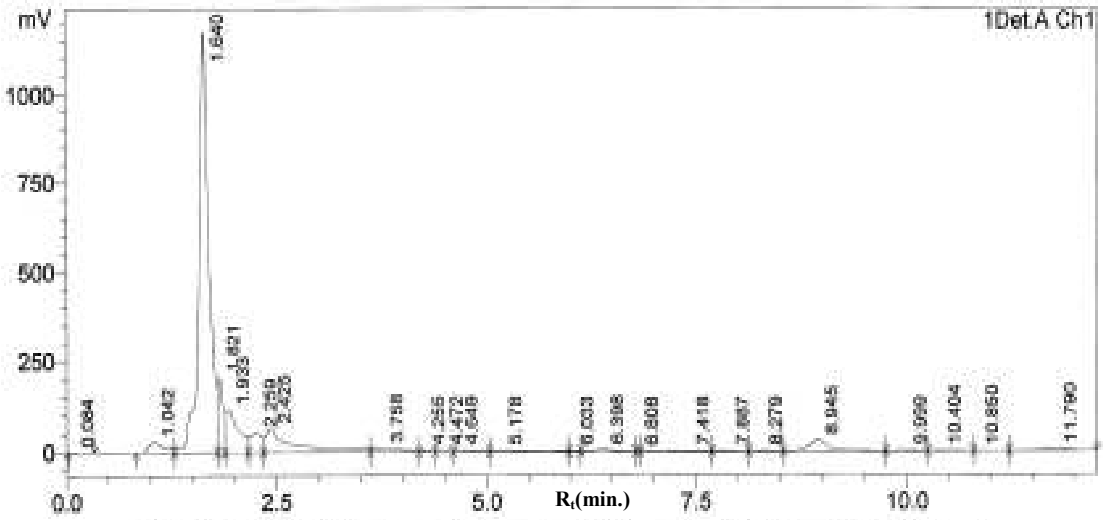
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.413	1202	101	0.004	0.004
2	0.935	5189	369	0.017	0.014
3	1.626	26028168	2272059	86.101	83.472
4	1.822	4080622	428060	13.499	15.726
5	2.242	32920	7045	0.109	0.259
6	2.400	50598	11114	0.167	0.408
7	2.864	8434	739	0.028	0.027
8	3.283	8037	1171	0.027	0.043
9	3.690	12263	1051	0.041	0.039
10	4.056	2448	240	0.008	0.009
Total		30229881	2721951	100.000	100.000

الشكل (٨) منحنى المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي عند الرش بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/لتر وبالمستوى الثاني من التسميد



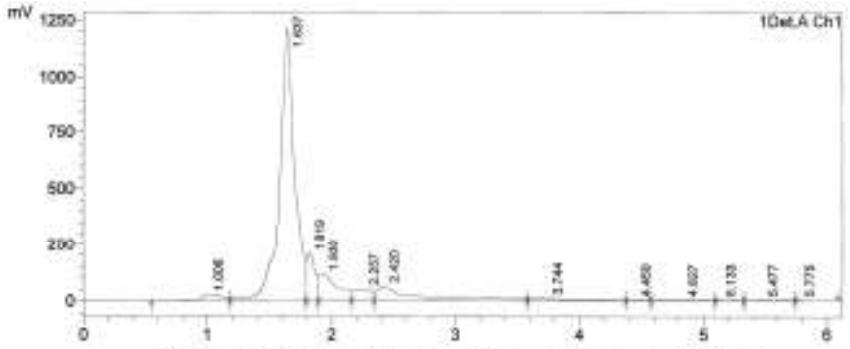
R_t(min.)

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.207	91380	9237	0.800	1.445
2	1.653	2315528	158857	20.284	24.847
3	1.829	564862	121247	4.948	18.964
4	1.949	971920	116843	8.514	18.275
5	2.117	4706663	116826	41.230	18.273
6	3.083	574714	41483	5.034	6.488
7	3.575	822214	37377	7.202	5.846
8	3.824	1368405	37480	11.987	5.862
Total		11415687	639349	100.000	100.000



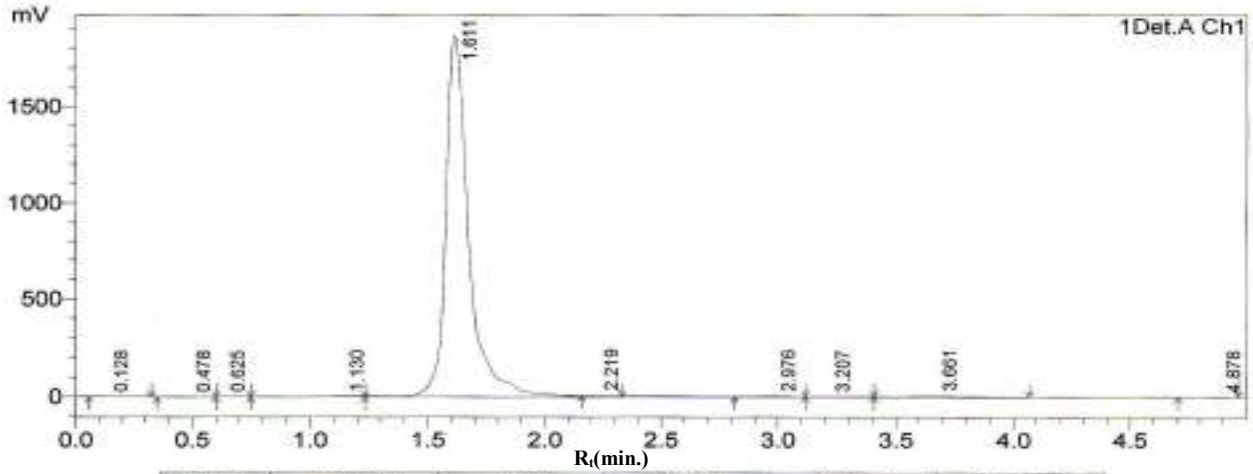
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.084	3204	1053	0.020	0.061
2	1.042	376469	26817	2.349	1.546
3	1.640	9549926	1175198	59.590	67.730
4	1.821	861830	206267	5.378	11.888
5	1.933	1229754	115431	7.673	6.653
6	2.259	522261	53142	3.259	3.063
7	2.425	1525535	64447	9.519	3.714
8	3.758	291596	11257	1.820	0.649
9	4.255	66280	5935	0.414	0.342
10	4.472	72972	5896	0.455	0.340
11	4.649	130705	5352	0.816	0.308
12	5.178	212230	5092	1.324	0.293
13	6.033	21775	2580	0.136	0.149
14	6.398	135626	6259	0.846	0.361
15	6.808	6653	1907	0.042	0.110
16	7.418	119864	2891	0.748	0.167
17	7.887	67033	2969	0.418	0.171
18	8.279	50974	2333	0.318	0.134
19	8.945	564771	30302	3.524	1.746
20	9.999	58292	2645	0.364	0.152
21	10.404	40154	1574	0.251	0.091
22	10.850	14088	719	0.088	0.041
23	11.790	104052	5060	0.649	0.292
Total		16026044	1735125	100.000	100.000

الشكل (١٠) منحنى المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي عند الرش بحامض الجبرليك تركيز ٥٠ ملغم/لتر وبدون تسميد



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.006	286115	25962	1.912	1.528
2	1.637	10177268	1214741	67.997	71.474
3	1.819	942748	209318	6.299	12.316
4	1.930	1161286	113277	7.759	6.665
5	2.257	504451	51480	3.370	3.029
6	2.420	1418526	63461	9.477	3.734
7	3.744	283444	9842	1.894	0.579
8	4.450	37664	3436	0.252	0.202
9	4.827	81824	2864	0.547	0.169
10	5.133	25810	2064	0.172	0.121
11	5.477	39790	2328	0.266	0.137
12	5.775	8905	778	0.059	0.046
Total		14967330	1699552	100.000	100.000

الشكل (١١) منحنى المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي عند الرش بحامض الجبرليك تركيز ٥٠ ملغم/لتر بالمستوى الثالث من التسميد



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.128	3298	328	0.025	0.017
2	0.478	2950	325	0.022	0.017
3	0.625	1192	149	0.009	0.008
4	1.130	24682	2441	0.188	0.130
5	1.611	12979244	1868516	98.701	99.123
6	2.219	9954	1660	0.076	0.088
7	2.976	20511	2887	0.156	0.153
8	3.207	6795	537	0.052	0.028
9	3.661	100195	8042	0.762	0.427
10	4.878	1262	162	0.010	0.009
Total		13150082	1885048	100.000	100.000

الشكل (١٢) منحنى المركبات الفينولية التي تم فصلها من المستخلص الايثانولي لمعاملة المقارنة (بدون رش) وبالمستوى الثالث من التسميد

الاستنتاجات:

تميزت الحشة الخريفية باعطاء أعلى نسبة مئوية لحامض الساليسيلك التي بلغت ٩٨.٧٠١٪ وعند التسميد بالمستوى الثالث ٩٢ كغم/هكتار. وتم الحصول على أعلى نسبة لوجود مركبي الكورسيتين والكاليك باستخدام التسميد النتروجيني بالمستوى الرابع ١٣٨ كغم/هكتار مع الرش بحامض الجبرليك تركيز ١٠٠ ملغم/لتر.

المصادر:

1- Bhat, S.; P. Maheshwari; S. Kumar & A. Kumar. "***Mentha*** spp.: In vitro Regeneration and genetic transformation". Molecular Biology Today. 3(1): 11-23. **2002**.

٢- الموسوي، علي حسين عيسى. علم تصنيف النبات. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. ص٣٧٩. ١٩٨٧.

٣- الراوي، علي. التوزيع الجغرافي للنباتات البرية في العراق. نشرة فنية رقم ١٤ مديرية البحوث والمشاريع الزراعية العامة. بغداد. العراق. ص١٤٩-١٥٩. ١٩٦٤.

4- Znini, M.; M. Bouklan, L. Majidi, S. Kharchouf, A. Aouniti, A. Bouyanzer, B. Hammouti. Chemical composition and Inhibitory effect of ***Mentha spicata*** essential oil on the corrosion of steel in Molar Hydrochloric acid. Int. J. Electro Chem. Sci., 6: 691-704. **2011**.

٥- احسان، سعد علي. دراسة بعض العوامل المؤثرة في الصفات الكمية والنوعية للزيوت العطرية في النعناع والبطيخ. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. ١٩٩٩.

6- Sushil, L. **2009**. www.sushilfinance.com

٧- رويحة، أمين. التداوي بالاعشاب. دار القلم للنشر. بيروت. لبنان. ص٢٩٦. ١٩٨٣.

8- Ozel, A. & M. Ozguven. "Effect of different planting times on essential oil components of different mint (***Mentha* Spp.**) varieties". Turk. J. Agric. For. 26(2): 289-294. **2002**.

9- Josip, M.; M. Milos & D. Kustrak. "Free and glycosidically bound volatiles of ***Mentha citrata* Ehrh**". Croatica Chemica Acta. 73(3): 781-794. **2000**.

١٠- الشحات، نصر أبو زيد. "الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية". الطبعة الثانية، مطبعة الدار العربية للنشر، القاهرة. ٢٠٠٠.

11- Singh, A. K.; H. Flora & G. D. Bagchi. "Effect of calliterpenone on growth, herb yield and oil quality of ***Mentha arvensis***". International Journal of Integrative Biology. 7(1): 53-57. **2009**.

12- Areias, F. M.; P. Valentao; P. B. Andrade; F. Ferreres & R. M. Seabra. "Phenolic fingerprint of peppermint leaves. Food Chemistry". 73(3): 307-311. **2001**.

13- Wikipedia. Anti-Inflammatory Drugs Analgesics Antiseptics, Benzoic acids, hydroxyl acids, phenols, plants hormones. **2009**.
http://En.wikipedia.org/wiki/salicylicacidcategories:non-steroidal

14- Corrado, T. Bioactive compounds from natural sources. Isolation characterization and biological properties. Also available as a printed book, stimultoneously published in the USA and Canada by Tayler & Francis Inc. 163-167. **2004**.

15- Lawrence, B. M.. "Mint: The Genus Mentha". Medicinal and aromatic plants - industrial profiles, CRC Press, Taylor & Franeis Group, Boca Raton, London. New York. **2006**.

16- Mahdi, V.; M. Khanavi; Y. Amanzadeh & H. Hajimedipoor. Quantification of gallic acid in fruits of three medicinal plants. Biolpharm Bull. (10)2: 233-236. **2011.**

17- Khera, K. L.; B. Singh; B. S. Sandhu & T. S. Aujula.. "Response of Japanese mint to nitrogen, irrigation and straw mulching on a sandyloam soil of Punjab (India)". Indian J. Agric. Sci. 56(6): 434-438. **1986**.

18- Anwar, M.; C. L. Sukhmal; A. A. Naqvi & D. D. Patra. "Effect of graded levels of nitrogen and sulphur on yield, nutrient accumulation and quality of Japanese mint (***Mentha arvensis***)". J. Indian. Soci. Soil Sci. 50(2): 174-177. **2002**.

19- Singh, P.; N. K. Srivastava; A. Mishra & S. Sharma. "Influence of ethereal and gibberellic acid on carbon metabolism, growth, and essential oil accumulation in spearmint (***Mentha spicata***)". Photosynthetica. 36(4): 509-517. **1999**.

20- Consuelo, M.; M. Soledad; M. A. Gonzalez & M. Dolores. "Influence of drying on the flavor quality spearmint (***Mentha spicata* L.**)". J. Agric. Food. Chem. 51: 1265-1269. **2003**.

21- Harborne, J. B.. "Phytochemical methods: A guide to modern technique of plant analysis". 1st ed., Cox & Wyman, London. 52-73. **1973**.

22- Nguyen, P. M. & E. D. Niemeyer. Effect of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (***Ocimum basilicum* L.**). **2008**. Retrieved from http://www.southwestern.edulacademics/bwp/vol8/niemeyer-vol8.pdf.

23- Shahram, S. & O. Alizadeh. Nutrient supply and fertilization of Basil-Advances in Environmental Biology. 5(5): 956-960. **2011**.

24- Hiltumen, R. & Y. Holm. Basil: the Genus Ocimum. Hardwood Academic publishers. **1999**.

٢٥- محمد، عبد العظيم كاظم. علم فسلجة النبات، الجزء الثاني، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، العراق. **١٩٨٥**.

26- Ganju, K.; B. Puri & Irwin L.. A systematic survey of bioflavanoids invegetables and fruits. Indian J. Med. Research, 47: 563-701. **1959**.