

## سنجش کیفی ترکیبات ثانوی اسانس گیاه *Mentha piperita* L. به روش های فیزیکی به عنوان جایگزین روش GC-MS

مژگان جمشیدیان<sup>۱</sup>، رضا دهقانی بیدگلی<sup>۲\*</sup>، مهرداد مرادی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>کارشناسی ارشد، گروه نانو فیزیک، پژوهشکده نانو، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

<sup>۲</sup>استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

<sup>۳</sup>دانشیار، گروه نانو فیزیک، پژوهشکده نانو، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۱۷

### چکیده

این تحقیق با هدف تشخیص ترکیبات اسانس گیاه نعناع فلفلی *Mentha piperita* L. با استفاده از روش طیفسنجی رامان و مقایسه آن با روش کروماتوگرافی و همچنین ارزیابی خلوص این اسانس با استفاده از طیفسنجی FTIR و آنالیز انکسارسنجی انجام گرفت. به این منظور ابتدا سرشاخه های هوایی گلدار گیاه از مزارع منطقه فین کاشان در سال ۱۳۹۸ جمع آوری گردید، استخراج اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر و سپس ترکیبات آن به وسیله کروماتوگرافی گازی متصل به جرم سنج جرمی (GC/MS) شناسایی گردید. با استفاده از روش سریع و کم هزینه طیفسنجی رامان که با سه دستگاه طیفسنج متفاوت دو ترکیب متون و متول مقایسه شدند. همچنین برای ارزیابی خلوص اسانس گیاه از روش انکسارسنجی و طیفسنج مادون قرمز (FTIR) استفاده شد، به این منظور غلظت های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۹۰ درصد اسانس نعناع فلفلی به صورت دستی توسط حلال سیکلوهگزان ساخته شد. غلظت های مختلف و اسانس خالص (غلظت ۱۰۰ درصد) توسط دستگاه انکسارسنجی و طیفسنجی مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج طیفسنجی مادون قرمز قادر به شناسایی اسانس نعناع فلفلی خالص و غلظت های رقیق شده آن نیست و فقط قادر به شناسایی مولکول های مختلف آن از نظر ساختار و کیفیت می باشد ولی با استفاده از آنالیز انکسارسنجی، غلظت های مختلف و نمونه خالص کاملاً از هم قابل تشخیص بودند. بنابراین آنالیز انکسارسنجی و طیفسنجی رامان روشی های سریع و کم هزینه ای هستند که قادر به شناسایی ترکیبات اصلی اسانس ها و تعیین درصد خلوص آن ها می باشد.

**واژه های کلیدی:** اسانس؛ کروماتوگرافی گازی؛ طیفسنج رامان؛ فرآکومتتر؛ طیفسنجی FTIR، نعناع فلفلی

می‌شود. به طوری که یکی از مهمترین مواد طعم دهنده بعد از وانیل و لیمو است (Subhash et al., 2017).

منتول ( $C_{10}H_{20}O$ ) یک ترکیب طبیعی با سه اتم کربن نامتقارن است، بنابراین به صورت چهار جفت ایزومر نوری به نام‌های (+) و (-) ایزومنتول، (+) و (-) منتول، (+) و (-) نئومنتول و (-) منتول وجود دارد. (-) منتول فرم اصلی منتول در طبیعت است که نسبت به سایر ایزومرهای منتول خاصیت خنک‌کنندگی بیشتری دارد (Kamatou et al., 2013). منتول همانند سایر ترپن الکلها از قبیل سیترونلول، ژرانیول، میرسنول، نرول و نرولیدول در طول موج‌های بین ۲۹۰ الی ۳۲۰ نانومتر طیف جذب ندارد اما در طول موج‌های کمتر از ۲۹۰ نانومتر طیف جذبی داشته و در طول موج ۲۲۰ نانومتر حداکثر جذب را دارد.

به طور متعارف، تجزیه و تحلیل اسانس‌ها با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی انجام می‌شود که نتایج قابل اطمینانی ارائه می‌دهد. کروماتوگرافی گازی<sup>۱</sup> روشی فیزیکی برای جداسازی اجزای اسانس به شمار می‌رود که اساس آن بر انتشار نمونه مورد آزمایش بین دو فاز ساکن (جامد) و فاز متحرک (گاز) می‌باشد. به علت پیچیدگی ترکیب‌های اسانس از نظر شیمیایی، مناسب‌ترین روش تجزیه آن‌ها، کروماتوگرافی گازی می‌باشد، در این روش فاز ساکن به صورت یک فیلم نازک روی یک جسم جامد بی اثر پخش شده و نمونه پس از انتشار بین دو فاز از فاز مایع جدا می‌گردد. حلال برای اجسام مختلف جذب متفاوت دارد، بنابراین در گاز حامل ترکیب‌ها به طور جداگانه از ستون خارج گردیده و پس از وارد شدن در آشکارساز ثبت می‌شوند. تشخیص اجزای به دست آمده به وسیله زمان بازداری<sup>۲</sup> آن‌ها صورت می‌گیرد

امروزه استفاده از اسانس‌ها به دلیل فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی توجه جهانی را به خود جلب کرده است. اسانس نعناع فلفلی به دلیل خواص درمانی ضدالتهاب، ضد میکروبی و محافظت‌کننده کبد و همچنین تأثیر خنک‌کنندگی آن، برای افزایش نفوذ پوست در داروها استفاده می‌شود (Silvia Imre, et al., 2016).

اگرچه بیشتر فراورده‌های دارویی مستخرج از نعناع فلفلی در ایران برای درمان ناراحتی‌های گوارشی، التهابات پوستی، سردردها، سرفه و التهابات گلو می‌باشد، اما مطالعات اخیر نشان دادند که نعناع فلفلی در بهبود بیماری‌های آرتیتری نیز مؤثر است و برخی شرکت‌های داروسازی، محصولاتش را جهت کاهش دردهای آرتیتری به بازار مصرف معرفی کرده‌اند (Rios-Esteva et al., 2008). کیفیت بالای اسانس گونه مورد مطالعه با درصد بالای منتول و منتون و پایین بودن غلظت پولگون و منتوفوران تعیین می‌شود. پولگون به عنوان یک ماده سمی برای کبد و احتمالاً سیستم عصبی شناخته شده است. این ترکیب در برگ‌های جوان نعناع فلفلی یافت می‌شود و با افزایش سن برگ به منتول تبدیل می‌شود (Herro and Jacob, 2010).

منتول یک مونوترپن الکل حلقوی با وزن مولکولی ۱۵۶/۳ گرم بر مول و چگالی ۰/۸۹ گرم بر سانتی‌متر مکعب است. منتول به مقدار خیلی جزئی در آب قابل حل (۴۳۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) است اما به راحتی در الکل‌ها، دی‌اتیل اتر و کلروفرم می‌شود (Sell., 2006). همراه با منتون، ایزومنتون و دیگر ترکیبات، مسئول ایجاد طعم و عطر خنکی نعناع می‌باشند. تخمین زده می‌شود که سالانه بین ۳۰۰۰۰ الی ۳۲۰۰۰ تن، منتول مصرف

1. Gas Chromatography (GC)  
2. Retention time (tR)

طریق مقایسه آن با داده های مشخص قبلی (طیف های استاندارد) و در نظر گرفتن شاخص هایی چون اندیس بازداری آن را تفسیر کرده و پی به مواد تشکیل دهنده نمونه می برند (McMaster, 2007). شایان ذکر است که امروزه در دستگاه های GC-MS به ندرت از ستون های پر شده استفاده می شود چرا که سرعت های بالای گاز حامل با بخش خلاء طیف سنج جرمی سازگار نیست و هم اکنون ستون های موئین از نوع سیلیکای مذاب و انعطاف پذیر برای این دستگاه ها ترجیح داده می شوند زیرا به طور مستقیم می توان آن ها را از دمای کروماتوگرافی گازی به منبع تولید یون در طیف سنج جرمی متصل نمود. طیف سنج جرمی در واقع وسیله ای برای شناسایی پیک های ارسالی کروماتوگرافی گازی در هنگام خروج آن ها از ستون خواهد بود (Bekhradi and Khayat kashani, 2006). روش کروماتوگرافی گازی در کنار مزایای زیادی که دارد، مساله هزینه و زمان بر بودن، از اشکالات مهم آن بشمار می آید. محققان همواره به دنبال روش های برای تجزیه و تحلیل اسانس ها هستند که بتواند جایگزین روش GC-MS شود.

در این مقاله از روش طیف سنجی رامان<sup>۲</sup> برای تشخیص ترکیبات اسانس و از روش انکسارسنجی<sup>۳</sup> برای ارزیابی خلوص و کیفیت اسانس ها استفاده شد. محققان زیادی سعی بر مقایسه این روش ها و جایگزین ساختن آن با روش کروماتوگرافی گازی کرده اند (Schulz Hartwig et al., 2005; Khoshroo et al., 2015; Delgado Ospina Johannes et al., 2016; Silvia Imre, et al., 2016). پدیده رامان تکنیکی ایده آل برای مطالعات بیولوژیکی است، چرا که آب یک پخش کننده ضعیف رامان به شمار می رود و در نتیجه تأثیر آن در شناسایی نمونه اصلی بسیار ناچیز خواهد بود. طیف سنجی رامان می تواند محدوده

(Stashenko and Martinez, 2014). امروزه برای جداسازی و تشخیص اجزای موجود در اسانس از ادغام دو دستگاه کروماتوگرافی و طیف سنج جرمی استفاده می گردد. در این روش، گاز حامل با ترکیب ها به طور جداگانه و در زمان های مختلف از ستون خارج شده و پس از وارد شدن در آشکارساز ثبت می شوند. پس قبل از یونیزه شدن اجزاء مخلوط در طیف سنج جرمی، ابتدا اجزای اسانس توسط کروماتوگرافی گازی از یکدیگر جدا می شوند. در سیستم GC-MS دستگاه کروماتوگرافی گازی به طور مستقیم به یک طیف سنج جرمی متصل می شود. در GC-MS مولکول های سازنده نمونه که به صورت خالص از انتهای ستون کروماتوگرافی گازی خارج می شوند، تحت تأثیر بمباران الکترونی قرار گرفته و به صورت یون های مثبت ( $M^+$  یون مولکول) در می آیند و یون مولکول نیز به یون های کوچکتر شکسته می شود. سری یون های تولید شده به صورتی تجزیه می گردند که برای هر مقدار  $m/z$  علامتی به دست می آید. شدت هر علامت فراوانی نسبی را منعکس می کند. شدت بزرگترین علامت که پیک پایه<sup>۱</sup> نامیده می شود، معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شده و شدت سایر علامت ها نسبت به آن سنجیده می شود. یک نمودار که نشان دهنده شدت های نسبی علامت ها در مقادیر مختلف جرم اتمی / عدد اتمی ( $m/z$ ) باشد، طیف جرمی را تشکیل می دهد که یک شاخص بسیار مهم از یک ماده خاص است. امروزه برای کنترل دستگاه GC-MS و داده های کمی آن، سیستم را به یک رایانه مجهز می کنند. این سیستم کامپیوتری می تواند برای کنترل GC-MS و ذخیره سازی و به کارگیری و بازخوانی داده ها به کار می رود. به این ترتیب برای هر جزئی (حتی در حد نانوگرم) که توسط کروماتوگرافی گازی جدا شده باشد، طیف جرمی به دست می آید که از

2. Raman spectroscopy

3. Refractometry

1. Base peak

طیف‌سنجی مادون قرمز یکی از پرکاربردترین روش‌ها در شناسایی کیفی مولکول‌های مختلف، تعیین ساختار مولکولی گونه‌های مختلف (مخصوصاً گونه‌های آلی) و شناسایی گروه‌های عاملی موجود در ساختار یک گونه می‌باشد (Rouessac and Rouessa, 2013).

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق سرشاخه‌های هوایی و گلدار گیاه نعناع فلفلی، در اوایل دوره گلدهی در سال ۱۳۹۸ از منطقه فین کاشان جمع‌آوری شد و در هوای آزاد و دور از نور مستقیم خورشید خشک گردید. سپس به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس آن استخراج شد. اجزای اصلی اسانس نعناع فلفلی شامل منتون و منتول بودند که توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شد (Baldinger, 1942). در مرحله بعد، از نمونه اسانس طیف رامان گرفته شد و به منظور صحت‌سنجی، دو ترکیب منتون و منتول که اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس بودند از یک پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی خریداری شد و از آن‌ها نیز طیف رامان گرفته شد در ادامه، طیف رامان ترکیبات منتون و منتول با طیف رامان اسانس مقایسه شد. به منظور اطمینان از نتایج طیف‌سنجی، با سه دستگاه طیف‌سنج مختلف، آزمایش‌ها انجام شد. طیف‌های رامان ثبت شده ابتدا با استفاده از طیف‌سنج رامان ساخت شرکت ASEQ در کشور کانادا انجام شد، کل زمان قرار گرفتن نمونه‌ها در معرض طیف رامان ۵ ثانیه، توان لیزر ۱۰۰ میلی‌وات و دقت طیف‌سنج ۰/۴ نانومتر بود. در این طیف‌سنج برای کاهش نویزهای موجود در طیف و افزایش دقت طیف‌های رامان از یک آشکارساز با قابلیت خنک‌کنندگی استفاده شد. برای اطمینان پیدا کردن از نتیجه این آزمایش با دو طیف‌سنج دیگر تکرار شد. طیف‌سنج دوم ساخت

وسیعی از نواحی طیفی را در بازه ۳۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر پوشش دهد. از آنجا که قطر پرتو لیزری که به عنوان منبع نوردهی در دستگاه طیف‌سنج رامان استفاده می‌شود، در حدود ۰/۲ تا ۲ میلی‌متر است، می‌توان با نمونه‌های بسیار ریز و با حجم کم هم کار کرد. علاوه بر این، حساسیت بالا، زمان کوتاه آزمایش، عدم نیاز به آماده‌سازی نمونه و غیره مخرب بودن این تکنیک، از جمله مزایای دیگری هستند که بر جدایی استفاده از طیف‌سنجی رامان افزوده‌اند (Khodabakhshiyani and Emadi, 2016).

انکسارسنجی به معنی تعیین ضریب شکست مواد شفاف و نیمه شفاف، به وسیله دستگاه انکسارسنج است. هنگامی که پرتو نور از محیطی به محیط دیگر با غلظتی متفاوت وارد می‌شود، به علت تغییر سرعت نور، مسیر آن منحرف می‌شود. این پدیده شکست نور<sup>۱</sup> نامیده می‌شود. هنگامی که محیط دوم چگال‌تر از محیط اول باشد، نور به خط عمود نزدیک‌تر می‌شود و در صورتی که غلظت کمتری داشته باشد از خط عمود بر سطح دور می‌شود. ضریب شکست یک ماده (n) به صورت: نسبت سرعت عبور نور در خلا (c) به سرعت عبور نور از آن ماده ( $V_i$ ) بیان می‌شود. ضریب شکست<sup>۲</sup> مانند نقطه ذوب از خواص فیزیکی مواد است. پس هدف دیگر این تحقیق تعیین خلوص اسانس خالص از غلظت‌های مختلف آن می‌باشد و نیز تا جایی که تحقیق شده کمتر مورد مطالعه واقع شده است.

روش دیگر برای تجزیه و تحلیل اسانس نعناع فلفلی استفاده از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز<sup>۳</sup> (FTIR) است. این طیف‌سنجی براساس جذب (Absorption) یا بازتابش (Reflection) امواج الکترومغناطیس در ناحیه طیفی مادون قرمز می‌باشد.

1. Refraction
2. Refractive index
3. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

منحصر به فرد است که نشان می‌دهد که چگونه اسانس با نور واکنش می‌دهد و سرعت نور در اثر برخورد با آن کم می‌شود. میزان شکست نور مانند اثر انگشت برای محلول‌های با غلظت، دما و فشار برابر منحصر به فرد است. رابطه طیف سنجی مادون قرمز<sup>۱</sup> و تراکم یک مایع موضوع بسیاری از مطالعات نظری و تجربی بوده است. اثرات طول موج و دما بر طیف سنجی مادون قرمز نیز مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده است که دما بیشترین حساسیت را در تجزیه و تحلیل نشان می‌دهد ( Delgado Ospina Johannes et al., 2016). بنابراین برای تجزیه و تحلیل کیفیت اسانس‌ها از طریق روش مقایسه با نمونه خالص از ضریب شکست استفاده می‌شود.

در آزمون دیگری نمونه خالص و غلظت‌های ساخته شده، توسط طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز<sup>۲</sup> مورد آنالیز قرار گرفت. در این روش، طیف FTIR نمونه اسانس‌های مختلف نعنای فلفلی با غلظت‌های متفاوت، توسط دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز مدل Magana550 ساخت شرکت Nicolet آمریکا، اندازه‌گیری شد. گسترده‌ترین کاربردهای طیف مادون قرمز به ناحیه طیفی ۴۰۰۰-۴۰۰ برسانتی متر مربوط است، که در گستره مادون قرمز میانه قرار دارد. این نمونه‌ها به صورت محلول هستند و همانطور که مشخص است، اکثر ترکیبات در محدوده مادون قرمز دارای جذب هستند، لذا یافتن یک حلال مناسب که در کل محدوده مادون قرمز شفاف باشد و جذبی از خود نشان ندهد، تقریباً امری غیرممکن است و از یک حلال خاص فقط می‌توان در یک محدوده خاص از ناحیه مادون قرمز استفاده کرد. به منظور گرفتن طیف FTIR نمونه‌ها، یک قطره از اسانس روی

شرکت طیف‌سنج تجهیز پیشرفته، با محدوده طول موجی ۱۵۰-۴۵۰۰ بر سانتی‌متر، زمان اندازه‌گیری نمونه‌ها ۰/۱ ثانیه و توان لیزر ۳۰۰ میلی وات می‌باشد. طیف‌سنج سوم طیف‌سنج رامان شرکت تکسان بود که بازه شیف رامان آن از ۱۰۰ تا ۶۰۰۰ می‌باشد، همه این طیف‌سنج‌ها مجهز به یک لیزر ۵۳۲ نانومتر هستند.

برای ارزیابی خلوص نمونه اسانس نعنای فلفلی خالص و نمونه‌های رقیق شده نمونه‌های اسانس نعنای فلفلی با غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۹۰ درصد ساخته شد که در آزمایشگاه به صورت دستی با سیکلوهاگزان رقیق شدند. در این آزمون از سیکلوهاگزان برای رقیق سازی اسانس نعنای فلفلی استفاده شد تا کیفیت اسانس نعنای فلفلی اصل را کاهش دهد و به اصطلاح اسانس نعنای فلفلی تقلبی تهیه شود. به طور مثال برای نمونه اسانس نعنای فلفلی ۳۰ درصد یعنی از ۳۰ درصد حجمی اسانس نعنای و ۷۰ درصد حجمی سیکلوهاگزان استفاده شده است. به منظور ارزیابی کیفی و میزان خلوص اسانس‌ها، روش‌های آنکسارسنجی FTIR و طیف‌سنجی استفاده شدند. در روش آنکسارسنجی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه رفاکتومتر مدل NAR-IT مورد آزمایش قرار گرفت. از آنجایی که ضریب شکست با دما رابطه‌ی عکس دارد و ضریب شکست اسانس‌ها باید در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد ثبت شود، چنانچه دما بالاتر و پایین‌تر باشد می‌بایست تصحیح دمایی صورت گیرد بنابراین باید دما حتماً اندازه‌گیری شود زیرا یک پارامتر تاثیر گذار در تعیین ضریب شکست است به این منظور دمای زمان قرائت نمونه‌ها ثبت گردید. در این آزمون یک قطره از اسانس در جایگاه مخصوص نمونه (منشور) قرار داده شد و با تنظیم پیچ دستگاه ضریب شکست نمونه اسانس خوانده شد. شاخص ضریب شکست نوری یک اسانس یک عدد

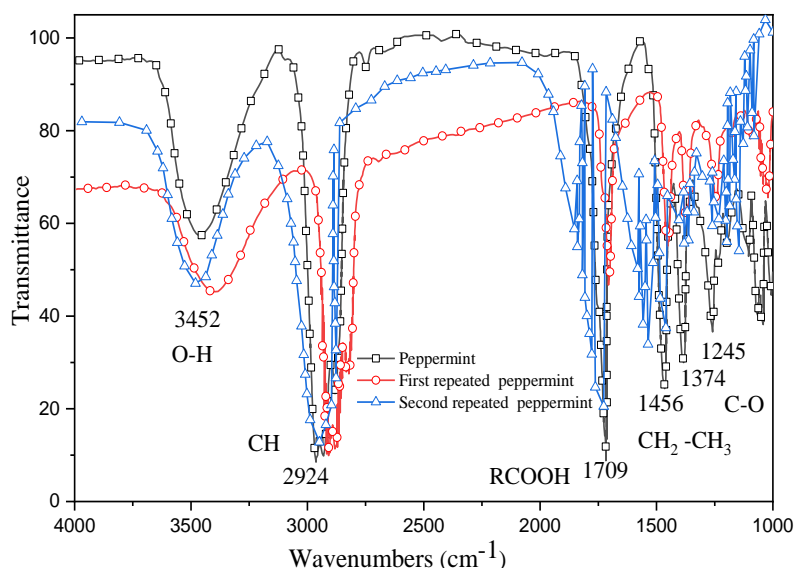
1. RI: InfraRed spectroscopy
2. FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy

نعناع فلفلی در محدوده ۳۶۰۰-۳۴۰۰ مربوط به گروه‌های عاملی O-H و قوی‌ترین پیک‌ها در محدوده ۲۸۵۰-۳۰۰۰، مربوط به پیوند CH است. پیک ۱۷۰۹ مربوط به کربوکسیلیک اسیدها است و پیک‌های ۱۴۵۶ و ۱۳۷۴ مربوط به گروه‌های عاملی  $CH_2$  و  $CH_3$  می‌باشد. پیک‌های در محدوده ۱۰۰۰-۱۳۲۰ مربوط به پیوند C-O که تقریباً پیک‌های ضعیفی هستند و بیانگر پیوند های یک مولفه اصلی نیستند. طیف‌های نعناع فلفلی از نظر کیفی و تعیین گروه‌های عاملی برابر هستند ولی از نظر کمی دارای مقدارهای متفاوت یا به اصطلاح طول هر پیک متفاوت است.

قرص پتاسیم برمید (KBr) ریخته شد و در دستگاه قرار گرفت (Skoog Douglas A et al., 2017).

## نتایج

طیف‌سنجی مادون قرمز: شکل ۱ طیف FTIR نمونه نعناع فلفلی خالص که سه مرتبه در سه روز متفاوت گرفته شده را نشان می‌دهد سپس غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۹۰ درصد به صورت دستی در آزمایشگاه ساخته شد و با دستگاه طیف‌سنجی FTIR مورد آنالیز قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود محور X بر اساس  $cm^{-1}$  و محور Y درصد عبور نور قرمز را نشان می‌دهد. طیف نمونه



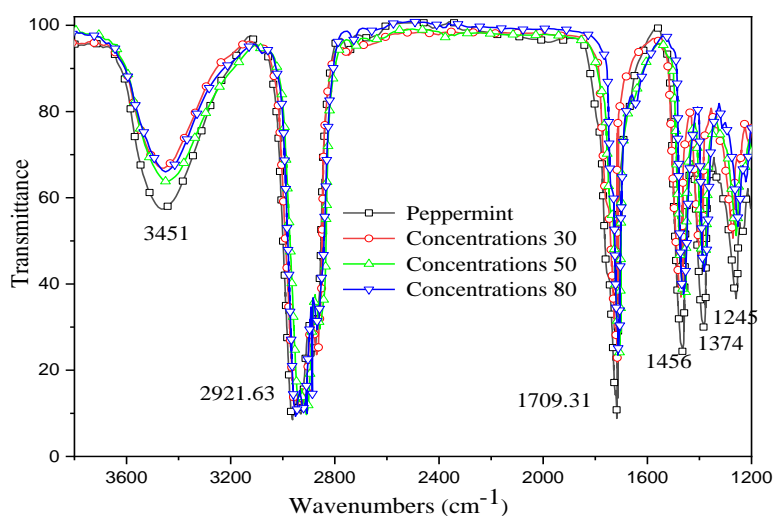
شکل ۱: طیف مادون قرمز نعناع فلفلی خالص با سه تکرار.

پیوندهای آن‌ها وجود ندارد اما مشاهده می‌شود که در ارتفاع پیک‌های نعناع فلفلی خالص و ارتفاع پیک‌های سه غلظت تفاوت وجود دارد و پیک‌های نعناع فلفلی خالص دارای ارتفاع بیشتری است ولی تفاوتی بین خود غلظت‌ها وجود ندارد. برای اینکه از صحت کار اطمینان حاصل شود غلظت‌های ۲۰ و ۹۰ درصد نیز ساخته و با طیف‌سنجی نعناع فلفلی خالص مقایسه شد.

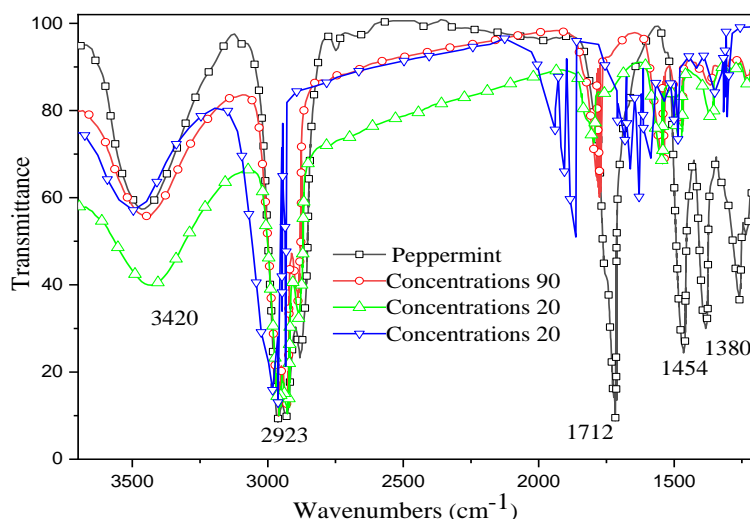
برای مقایسه خلوص نعناع فلفلی اصل از تقلبی (اسانس رقیق شده با حلال)، طیف مادون قرمز غلظت‌های ۳۰، ۵۰ و ۸۰ درصد گرفته شد و با نمونه خالص مورد مقایسه قرار گرفت.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود طیف نعناع فلفلی با غلظت ۳۰، ۵۰، ۸۰ و خالص از لحاظ تعیین گروه‌های عاملی یکی هستند و هیچ تغییری در

برای اطمینان از تکرار پذیر بودن، طیف غلظت ۲۰ گرفت. درصد با دو تکرار گرفته شد و مورد مقایسه قرار



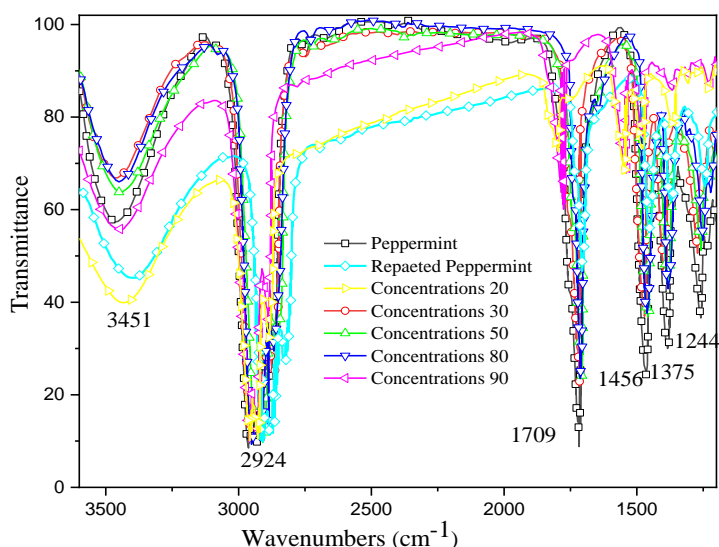
شکل ۲: طیف مادون قرمز نمونه‌ها با غلظت ۳۰، ۵۰، ۸۰ درصد و نمونه خالص.



شکل ۳: طیف مادون قرمز نمونه‌ها با غلظت ۲۰ و ۹۰ درصد، نمونه خالص و تکرار نمونه ۲۰ درصد.

ارتفاع پیک‌های نعنای خالص با دیگر غلظت‌ها تفاوت وجود داشت و ارتفاع پیک نعنای فلفلی خالص بلندتر بود ولی با تکرار کردن طیف نعنای فلفلی خالص و مقایسه با کل طیف‌ها که در شکل ۴ آمده این موضوع مشخص شد که طیف سنجی مادون قرمز در تعیین خلوص کارایی ندارد و فقط قادر به تعیین گروه‌های عاملی نمونه‌ها است.

همانطور که شکل‌های ۳ و ۴ نشان می‌دهند طیف سنجی مادون قرمز قادر به شناسایی کمی اسانس نعنای فلفلی خالص و غلظت‌های رقیق شده آن نیست و فقط قادر به شناسایی کیفی مولکول‌های مختلف، تعیین ساختار مولکولی گونه مختلف (مخصوصاً گونه‌های آلی) و شناسایی گروه‌های عاملی موجود در ساختار یک گونه می‌باشد. درست است که در ابتدا



شکل ۴: طیف مادون قرمز نمونه‌ها با غلظت ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۸۰، ۹۰ درصد نمونه خالص و تکرار نمونه خالص.

سانتی‌گراد و  $n_D^{t*}$  ضریب شکست در دمای زمان آزمایش است. با استفاده از فرمول ۱ ضریب شکست در دمای ۲۰ درجه به دست آمده که در نمودار شکل ۵ قابل مشاهده است.

همانطور که مشاهده می‌شود تغییرات قابل توجهی میان ۷ نمونه وجود دارد. با توجه به معادله خطی شماره ۲ که از برازش بر روی منحنی شکل ۵ به دست آمده است، می‌توان  $y$  که بیانگر ضریب شکست و  $x$  که غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد به دست آورد. همانطور که از معادله ۲ مشخص است مقدار شیب این منحنی برابر با  $0.000325$  با مقدار خطای  $0.000025$  و مقدار عرض از مبدأ  $1.428$  با مقدار خطای  $0.00016$  است پس به سادگی می‌توان نمونه‌ها را از هم تشخیص داد.

$$y = 1.428 + 0.000325x \quad (2)$$

این نشان می‌دهد که RI نه تنها یک پارامتر کیفی بلکه یک پارامتر متریک است که می‌تواند با دقت قابل قبولی غلظت‌های مختلف از اسانس را تشخیص دهد. پس به راحتی با استفاده از روش انکسارسنجی خلوص اسانس نعناع فلفلی مشخص می‌شود.

انکسارسنجی: در آزمون دیگر از ضریب شکست (RI) برای تعیین خلوص و تجزیه و تحلیل اسانس‌ها استفاده شد. بنابراین ضریب شکست هر نمونه سه مرتبه گرفته شد و متوسط عددی آن‌ها محاسبه گردید.

جدول ۱: ضریب شکست اسانس نعناع فلفلی با غلظت‌های مختلف

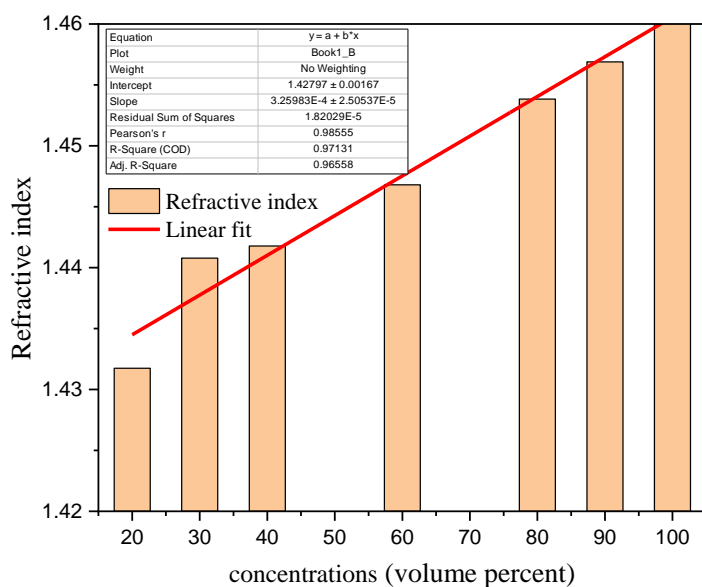
غلظت اسانس (درصد)	ضریب شکست	
	دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد	دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد
۲۰	۱/۴۳۱۷	۱/۴۲۸۵
۳۰	۱/۴۴۰۷	۱/۴۳۷۵
۴۰	۱/۴۴۱۷	۱/۴۳۸۵
۶۰	۱/۴۴۶۸	۱/۴۴۳۶
۸۰	۱/۴۵۳۸	۱/۴۵۰۶
۹۰	۱/۴۵۶۸	۱/۴۵۳۶
۱۰۰	۱/۴۶۰۹	۱/۴۵۷۶

همانطور که از جدول ۲ مشاهده می‌شود ضرایب شکست در دمای ۲۸ درجه اندازه‌گیری شده‌اند و با فرمول تصحیح دما ضریب شکست در دمای ۲۰ درجه گزارش شد.

$$n_D^t = n_D^{t*} + 0.0004(t^* - t) \quad (1)$$

در فرمول ۱ ضریب شکست در دمای ۲۰ درجه





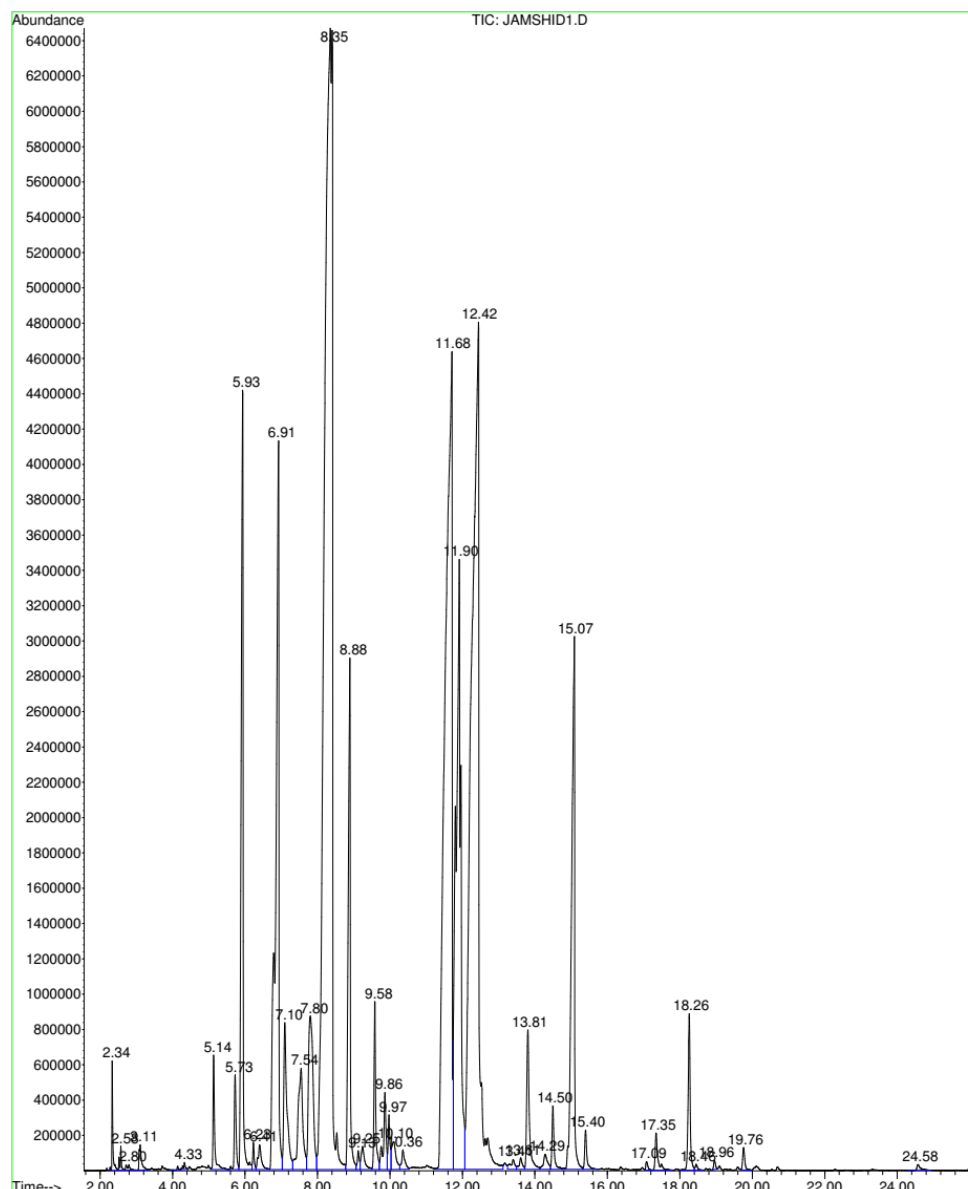
شکل ۵: منحنی تغییرات ضریب شکست غلظت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی.

طیف رامان ترکیبات منتون و منتول توسط طیف سنج ASEQ نشان داده شده است.

جدول ۲: ترکیبات اصلی متشکله نمونه اسانس گیاه با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

شماره	ترکیب	مقدار (درصد)
۱	Menthone	۱۵/۸۷
۲	Menthol	۱۸/۰۹
۳	D-Limonene	۲۶/۶۵
۳	B – pinene	۶/۵۴
۴	Gamma – terpinene	۲/۹۶
۵	مجموع حدود ۳۵ ترکیب دیگر	۲۹/۸۹

طیف‌سنجی رامان: برای مشخص شدن اجزاء اسانس از دستگاه کروماتوگرافی استفاده شد. شکل ۶ نمودار کروماتوگرام نعناع فلفلی را نشان می‌دهد که نتایج آن در جدول شماره ۲ آورده شده است. با توجه به نتایج این آنالیز اسانس نعناع فلفلی مورد آزمون شامل ۴۰ ترکیب می‌باشد. در میان این ۴۰ ترکیب، منتون، منتول و دی‌لیمونن اجزای اصلی می‌باشند که مقدار درصد آن در جدول ۲ بیان شده است. از آنجایی که منتون و منتول جزء ترکیبات اختصاصی اسانس نعناع فلفلی می‌باشند در تحقیق انتخاب شدند و مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. در شکل ۷ طیف رامان اسانس و

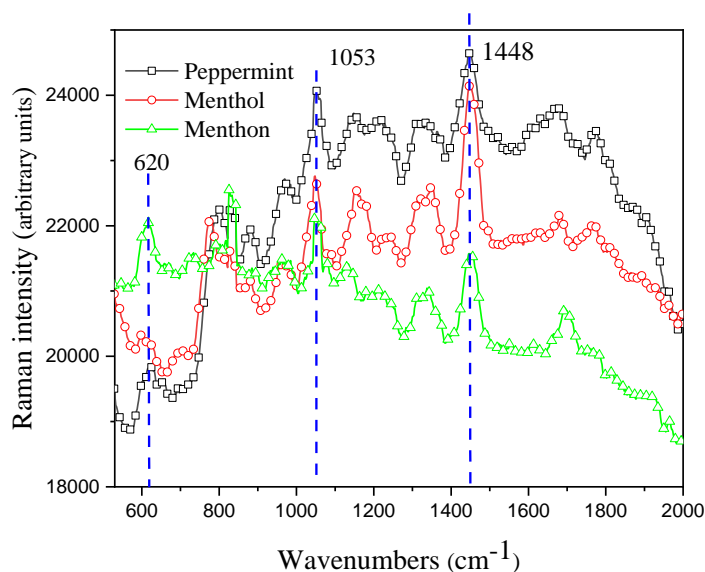


شکل ۶: نمودار کروماتوگرام نعنای فلفلی.

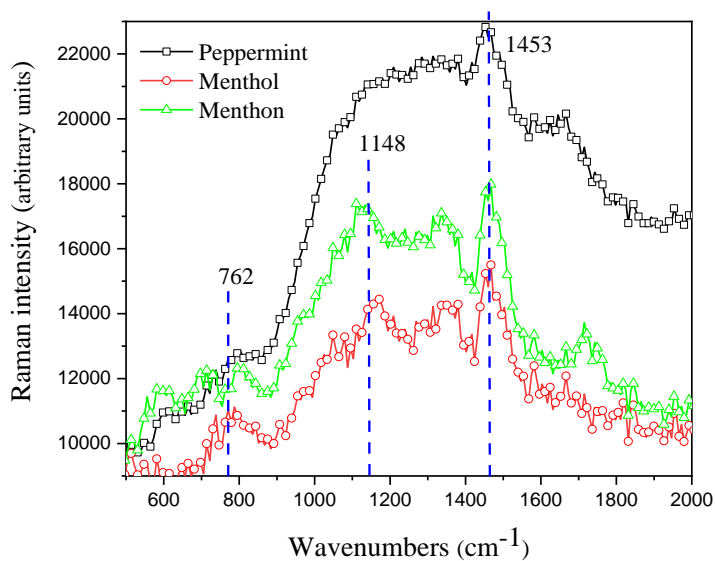
همانطور که در طیف رامان شکل ۷ مشاهده می‌شود قله‌های ۱۴۴۸، ۶۲۰ و ۱۰۵۳ بر سانتی‌متر قله‌های نمونه اسانس و ترکیبات منتون و منتول می‌باشد و از آنجایی که درصد بالایی از اسانس را منتون و منتول تشکیل داده است، طیف اسانس شباهت زیادی به طیف‌های آن‌ها دارد و ترکیباتی که درصد کمتری از اسانس را تشکیل می‌دهند تاثیر کمتری بر روی طیف اسانس گذاشته اند. از طرفی طبق تحقیقات انجام شده توسط محققان دیگر

(Jentzsch Paul et al., 2015) با صحت کامل می‌توان گفت که قله‌های ۱۴۴۸ و ۶۲۰ بر سانتی‌متر را به عنوان مشخصه‌های منتول و منتون در نظر گرفته شود، بنابراین طیف‌سنجی رامان به خوبی قادر به مشخص کردن منتون و منتول در یک نمونه مجهول خواهد بود. برای اطمینان پیدا کردن از نتیجه این آزمایش با دو طیف‌سنج دیگر آزمایش تکرار شد و از طیف سنج رامان ساخت شرکت طیف‌سنج تجهیز پیشرفته استفاده شد.

همانطور که در طیف رامان شکل ۷ مشاهده می‌شود قله‌های ۱۴۴۸، ۶۲۰ و ۱۰۵۳ بر سانتی‌متر قله‌های نمونه اسانس و ترکیبات منتون و منتول می‌باشد و از آنجایی که درصد بالایی از اسانس را منتون و منتول تشکیل داده است، طیف اسانس شباهت زیادی به طیف‌های آن‌ها دارد و ترکیباتی که درصد کمتری از اسانس را تشکیل می‌دهند تاثیر کمتری بر روی طیف اسانس گذاشته اند. از طرفی طبق تحقیقات انجام شده توسط محققان دیگر



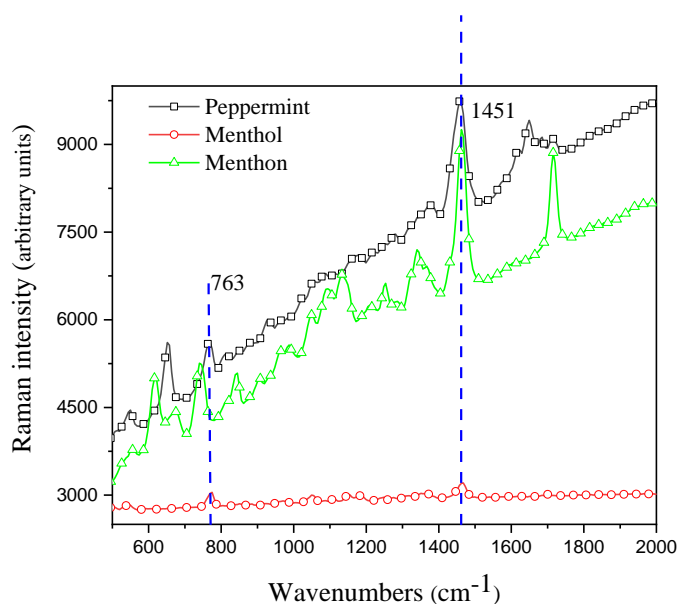
شکل ۷: طیف رامان نمونه‌های منتون، منتول و اسانس نعناع فلفلی توسط طیف‌سنج ASEQ ساخت کشور کانادا.



شکل ۸: طیف رامان نمونه‌های منتون، منتول و اسانس نعناع فلفلی توسط طیف‌سنج رامان شرکت تجهیز پیشرفته.

منتون و منتول می‌باشد. برای اطمینان از نتیجه این آزمایش نمونه‌ها به موسسه گوهرشناسی دانشگاه شهید بهشتی فرستاده شد که در این موسسه، از طیف‌سنج رامان شرکت تکسان برای آنالیز نمونه‌ها استفاده می‌شود. نتایج این طیف‌سنجی در شکل ۹ آورده شده است.

همانطور که در طیف رامان شکل ۸ مشاهده می‌شود یک پیک در  $1453 \text{ cm}^{-1}$  و یک پیک ضعیف در محدوده  $762 \text{ cm}^{-1}$  وجود دارد که مشخصه اصلی وجود ترکیبات منتون و منتول است. یک قله قوی نیز برای ترکیب منتون و منتول در  $1148$  بر سانتی متر نیز وجود دارد که بخاطر وجود ترکیبات



شکل ۹: طیف رامان نمونه‌های منتون منتول و اسانس نعناع فلفلی توسط طیف‌سنج رامان شرکت تکسان.

همانطور که در طیف رامان شکل ۹ مشاهده می‌شود یک قله قوی در ۱۴۵۱ برسانتی متر و یک قله نسبتاً ضعیف در ۷۶۹ برسانتی متر وجود دارد. به وضوح مشخص است که مشخصه اصلی ترکیب منتون پیک  $1451 \text{ cm}^{-1}$  است و مشخصه اصلی ترکیب منتول پیک  $769 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد، بر طبق تحقیقاتی که گروه‌های دیگر بر روی نمونه اسانس نعناع فلفلی انجام داده‌اند. یک قله در  $1457 \text{ cm}^{-1}$  به‌طور خاص مربوط به منتون و یک قله قوی در  $769 \text{ cm}^{-1}$  به منتول مربوط ساخته‌اند (Jentsch Paul et al., 2015). اکنون با اطمینان می‌توان گفت که طیف‌سنجی رامان به خوبی قادر به مشخص کردن منتون و منتول در یک نمونه مجهول می‌باشد. در جدول ۳ قوی‌ترین قله‌های مشاهده شده با طیف‌سنج‌های مختلف برای ترکیبات منتون، منتول و نمونه اسانس برای مقایسه آورده شده است. همانطور که مشخص است قله مشخصه برای منتون در محدوده ۱۴۴۸ تا ۱۴۵۷ برسانتی متر می‌باشد و برای منتول در محدوده ۶۲۰ تا ۷۶۹ برسانتی متر اتفاق می‌افتد.

جدول ۳: نتایج آنالیز ۳ مدل طیف‌سنجی رامان متفاوت.

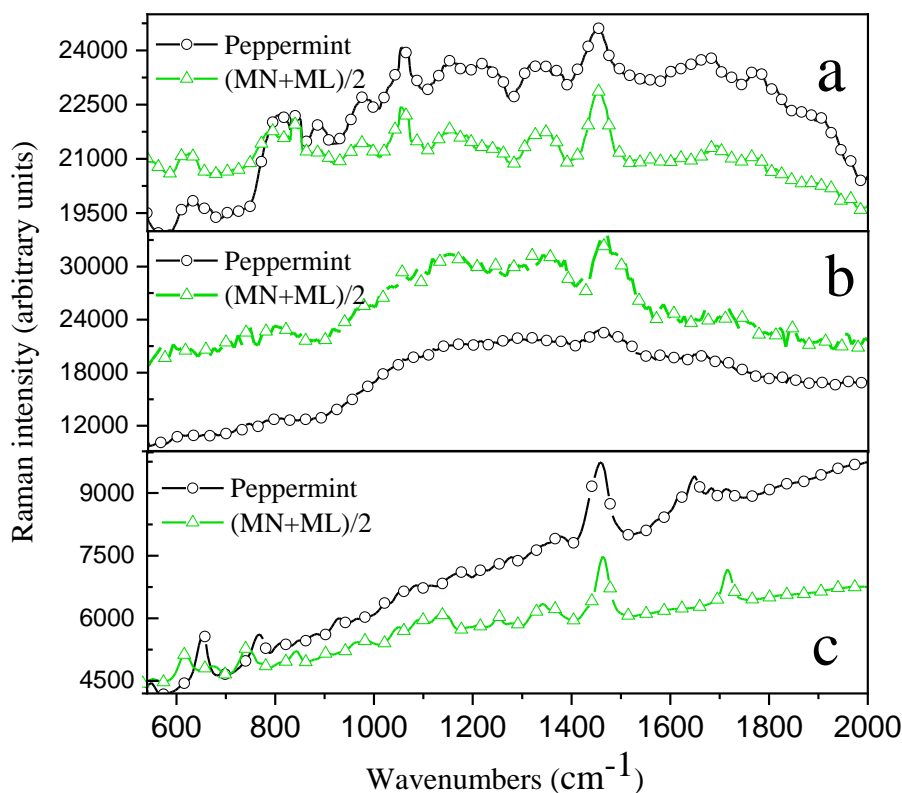
قوی‌ترین قله‌ها (برسانتی متر)				مدل طیف‌سنج
اسانس	منتول	منتون	منتون	
۶۱۷	۱۴۴۸	۶۲۰	۱۴۴۸	ASEQ
۷۷۰	۱۴۶۰	۷۶۲	۱۴۵۳	تجهیز پیشرفته
۷۶۳	۱۴۵۷	۷۶۹	۱۴۵۱	تکسان
۷۶۹	۱۴۵۷	۷۶۹	۱۴۵۷	(Jentsch Paul et al., 2015)

با مقایسه سه طیف‌سنج مورد استفاده شده در این تحقیق مشخص است که طیف‌های گرفته شده توسط طیف‌سنج رامان تکسان، فلورسانس کاملاً حذف شده، دارای قدرت تفکیک بالا ولی طیف‌های گرفته شده

توسط طیف‌سنج سه طیف‌سنج مورد استفاده شده در این تحقیق مشخص است که طیف‌های گرفته شده توسط

نتایج، طیف رامان منتون که با نماد (MN) و منتول که با نماد (ML) را میانگین گرفته و با طیف اسانس نعنای مقایسه شد. با انجام این کار شباهت میانگین پیک‌های منتون و منتول با اسانس نعنای فلفلی مشخص شد و همانطور که مشخص است شکل a طیف رامان طیف سنج ASEQ، شکل b طیف سنج تجهیز پیشرفته در دانشگاه کاشان و شکل c طیف سنج تکسان در دانشگاه شهید بهشتی می‌باشد. شکل a تشابه خیلی زیادی وجود دارد پس فرضیات این تحقیق را تایید می‌کند که در طیف رامان اسانس نعنای فلفلی به خاطر وجود ترکیبات منتون و منتول، میانگین طیف‌های حاصله از طیف دو ترکیب منتون و منتول به وجود آمده است.

با طیف‌سنج رامان شرکت تجهیز پیشرفته کیفیت پایینی دارد و همانطور که مشخص است پیک‌ها را پهن نشان می‌دهد بنابراین قدرت تفکیک خوبی ندارد ولی تقریباً فلورسانس کاهش یافته است. در طیف‌های گرفته شده با طیف سنج ASEQ مشخص است که تغییرات نرم افزاری روی طیف‌ها اعمال نشده است و طیف‌ها کاملاً دارای فلورسانس هستند ولی قدرت تفکیک این دستگاه نسبتاً زیاد است. با اینکه برای هر سه طیف سنج جواب‌های متفاوتی به دست آمد اما هر سه طیف سنج پیک‌های منتون و منتول را نشان می‌دهند پس از هر طیف‌سنجی که استفاده شود و پیکی در این محدوده‌ها داشته باشد می‌تواند اسانس نعنای فلفلی را مشخص کند. اکنون برای اطمینان از



شکل ۱۰: (a) نمودار میانگین طیف منتون و منتول و نمودار طیف اسانس طیف‌سنج ASEQ، (b) نمودار میانگین طیف منتون و منتول و نمودار طیف اسانس طیف‌سنج تجهیز پیشرفته در دانشگاه کاشان، (c) نمودار میانگین طیف منتون و منتول و نمودار طیف اسانس طیف‌سنج تکسان در دانشگاه شهید بهشتی.

## بحث

سنجی ارتعاشی از جمله طیف سنجی رامان و رامان تبدیل فوری، در بعضی موارد استفاده از روش مکمل طیف سنجی جذبی مادون قرمز و همچنین استفاده از روش‌های تحلیل چند متغیره. در این مقالات سعی شده است که روش‌های سریع، ارزان و غیرتهاجمی طیف سنجی با روش کروماتوگرافی گازی مقایسه شود و به‌عنوان جایگزینی برای آن ارائه شود. در سال ۲۰۰۶ گروهی توسط طیف سنجی رامان تبدیل فوریه و ترکیب آن با تحلیل چندمتغیره و استفاده از رگرسیون به تشخیص تقلب در خلوص روغن رازیانه و پیش‌گویی عناصر اصلی و درصد خلوص آن پرداختند (Stefanini et al., 2006). در سال ۲۰۰۲ گروهی در یونان با طیف سنجی رامان تبدیل فوریه با مقایسه طیف ترپنها و اسانس نعنای به تشخیص ترکیب اصلی این اسانس پرداخته است (Jana et al., 2002).

در سال ۲۰۱۴ گروهی در آلمان به تحلیل اسانس‌های گیاهان مختلفی از جمله ریحان، آویشن، بابونه و پونه کوهی و تفکیک شیمیایی آنها توسط چند روش طیفسنجی ارتعاشی، طیف سنجی رامان/جذب مادون قرمز، و روش تحلیل چندمتغیره خوشه‌بندی و بازتاب کلی تضعیفی/مادون قرمز پرداخته‌اند (Gudi et al., 2014). خوشرو و همکاران (Khoshroo et al., 2015) از روش طیفسنجی رامان و فلورسانس برای تحلیل کمی و کیفی اسانس آویشن استفاده نمودند و نتایج آن‌ها نشان داد که طیف‌سنجی رامان توانایی تشخیص تیمول به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس آویشن را دارد که این نتیجه با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد ولی در این تحقیق به ارزیابی خلوص نیز پرداخته شده است.

سلویا امر و همکاران<sup>۱</sup> (Silvia Imre et al., 2016) بر روی خلوص و کیفیت اسانس نعنای

طیف رامان همانند نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی و طیف‌سنج جرمی وجود منتون و منتول را به خوبی نشان می‌دهد. کروماتوگرافی گازی روشی پیچیده است که امکان شناسایی و تعیین کمیت مواد تشکیل‌دهنده اسانس‌ها را به صورت دقیق فراهم می‌کند. از طرف دیگر، روش انکسارسنجی در ارزیابی شباهت در ترکیب اسانس‌ها اثربخش بوده است، زیرا از لحاظ ترکیبات می‌تواند تفاوت بین غلظت‌های مختلف نمونه را تشخیص دهد ولی طیف سنجی FTIR یک تکنیک کیفی است که قادر به شناسایی گروه‌ها و پیوندهای عاملی یک نمونه می‌باشد پس کارایی لازم در تعیین خلوص غلظت‌های متفاوت اسانس یک گونه را ندارد زیرا از نظر گروه عاملی یکسان می‌باشند. طیف‌سنجی FTIR برای تقلبی یا اصل بودن دو نمونه متفاوت مانند اسانس‌های تجاری و خانگی کارایی دارد. در نهایت روش رامان و انکسارسنجی را به‌عنوان جایگزینی مناسب، کم‌هزینه و سریع تر نسبت به روش کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنج جرمی در تجزیه و تحلیل اسانس نعنای فلفلی معرفی کرد.

روش‌های طیف سنجی که اساس آنها ارتعاش مولکولی است معمولاً به دو دسته طیف سنجی رامان برپایه پراکندگی غیرکشسان و طیفسنجی جذب مادون قرمز تقسیم می‌شوند. در این نوع طیف سنجی ماده یک الگوی مختص به خود در طیف‌ها ارائه می‌دهد که این الگو اطلاعات کاملی را در مورد ساختار مولکولی نمونه به ما می‌دهد. نمونه‌ها می‌توانند جامد، مایع یا حتی گاز باشند.

در رابطه با تحلیل مواد روغنی از جمله اسانس‌های گیاهی و روغن‌های خوراکی از سال ۱۹۹۶ تا سال ۲۰۰۹ به مقالات گوناگونی بر می‌خوریم که در این مقالات عموماً دوچیز مشترک هستند: روش‌های طیف

1. Silvia Imre

اثبات کیفیت اسانس های تجاری مورد استفاده قرار گیرد.

### نتیجه گیری نهایی

نعناع فلفلی یک منبع طبیعی و مقرون به صرفه برای تولید منتول است که در صنایع مختلف غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی کاربرد فراوانی دارد. نعناع فلفلی بومی ایران نیست و از اینرو در طب ایرانی جایگاهی برای آن تعریف نشده است اما نتایج مطالعات فارماکولوژی و بالینی اثرات متعدد درمانی آن را برای اسانس و عصاره این گیاه اثبات کرده اند. اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی دارای ترکیبات متنوعی است که کمیت و کیفیت آن به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی و زراعی می باشد اسانس این گونه گیاهی از اجزای مختلفی تشکیل شده است که هر کدام کارایی خاص در صنعت و درمان دارد. مهمترین ترکیبات فیتوشیمیایی نعناع فلفلی در اسانس آن است که ارزش آن به میزان منتول، منتون، پولگون و متفوران بستگی دارد. در تحقیق حاضر خلوص اسانس با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز بررسی شد و از آنجایی که در این تحقیق از یک نمونه اسانس با غلظت های متفاوت استفاده شده است، طیف سنجی مادون قرمز به عنوان یک تکنیک کیفی، قادر به تشخیص غلظت های متفاوت نبود زیرا این نمونه ها گروه های عاملی یکسانی دارند. در تحقیق صورت گرفته توسط محققین مورد اشاره از آنجایی که اسانس های مورد مطالعه به صورت تجاری و خالص بوده اند و گروه عاملی های متفاوتی داشته اند، طیف سنجی مادون قرمز قادر به تشخیص کیفیت آن ها بوده است. در نتیجه به منظور سرعت بخشیدن در شناسایی اجزاء اصلی اسانس این گونه گیاهی (منتون و منتول) می توان از روش انکسارسنجی و طیف سنجی رامان استفاده کرد.

اسطوخودوس موجود در بازار از تولیدکنندگان مختلف تجاری، تحقیق کردند. روش های مورد استفاده برای آزمایش کیفیت این اسانس ها انکسارسنجی، پلاریمتری، لایه نازک و کروماتوگرافی گازی است. پس از نتایج تحلیلی، تمام نمونه ها از نظر کیفیت و خلوص با برخی از آن ها که با مواد دیگر آلوده شده و یا حتی رقیق شده اند، مقایسه کردند. نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر در تعیین خلوص اسانس با استفاده از روش انکسارسنجی مطابقت دارد. تا کنون در مورد سنجش خلوص اسانس با استفاده از تکنیک انکسارسنجی در داخل کشور تحقیقی صورت نگرفته است و تحقیق حاضر از این نظر دارای نوآوری می باشد همچنین در این تحقیق تشخیص ترکیبات اصلی با استفاده از طیف سنجی رامان نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

دقیوچه<sup>۱</sup> و همکاران (Daghbouche, et al., 2018) در الجزایر با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) برای کنترل سریع کیفیت اسانس های تجاری از اسانس های خالص تحقیق کردند. ۴۷ نمونه از بازار الجزایر و اسپانیا خریداری کردند و مستقیماً بدون هیچگونه آماده سازی قبلی، با طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (ATR-FTIR) اندازه گیری انجام شد. اسانس خالص با روش های آب و بخار استخراج شد و طیف ATR آن ها را به دست آوردند. نتایج موجود نشانگر وجود حلال ها در برخی فرمولاسیون های تجاری و تأیید هویت سریع اسانس های خالص به راحتی از آن هایی که رقیق شده اند. روش پیشنهادی یک روش سریع و سازگار با محیط زیست ارائه می دهد که می تواند به عنوان جایگزینی برای روش های کروماتوگرافی متداول برای

1. Daghbouche
2. Absorb total reflection

داشته باشد.

این موضوع می تواند در شناسایی اسانس خالص از نمونه های ناخالص و بعضا تقلبی کاربرد موثری

## References

- Baldinger, L. 1942. Analysis of peppermint oil. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition, 14(1): 15-20.
- Bekhradi, R., Khayat kashani, M. 2006. Therapeutic applications of herbal essences. Morsal. Pp.267.
- Bounaas, K., Bouzidi, N., Daghbouche, Y., Garrigues, S., de la Guardia, M. and El Hattab, M. 2018. Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy. Journal of Microchemical, 139: 347-356.
- Delgado Ospina, J., Grande Tovar, C.D., Menjívar Flores, J.C. and Sánchez Orozco, M.S. 2016. Relación entre el índice de refracción y la concentración de timol en aceites esenciales de *Lippia origanoides* Kunth. Chilean Journal of agricultural and animal sciences, 32(2): pp.127-133.
- Gudi, G., Krahmer, A., Kruger, H. and Henning, H. 2014. "Discrimination of fennel chemotypes applying IR and Raman spectroscopy: Discovery of a New  $\gamma$ -Asarone Chemotype", Journal of Agriculture and Food Chemistry, 62(4): 3537-3547.
- Herro, E. and Jacob, S.E. 2010. *Mentha piperita* (Peppermint). Journal of Dermatitis, 21(6): 327-329.
- Imre, S., Eşianu, S.I.G.R.I.D., Miklos, A., Tiuca, I., Dicher, I., Tero-Vescan, A., Muntean, D.L. and Oprean, R. 2016. Qualitative assay of essential oils of Lavender and Peppermint in commercial products through spectral and chromatographic methods. Journal of Farmacia, 64(6): 857-862.
- Jana, N., Gearheart, L. and Murphy, C. 2002. "essential oil constituents of *Mentha sativa*", Journal of Langmuir, 17(22): 6782-6786.
- Jentzsch, P., Ramos, L. and Ciobotă, V. 2015. Handheld Raman spectroscopy for the distinction of essential oils used in the cosmetics industry. Journal of Cosmetics, 2(2): 162-176.
- Kamatou, G.P.P., Vermaak, I., Viljoen, A.M. and Lawrence, B.M. 2014. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. Journal of Phytochemistry, 96: 15-25.
- Khodabakhshian, R., Emadi, B. 2016. Determination of matzafi date maturity stages using Raman spectroscopy. Journal of Agricultural Machinery, 6(1): 201-213.
- Khoshroo, H., Khadem, H., and Tavassoli, H. 2015. The effect of fluorescence removal from Raman spectra in quantitative analysis of Thyme essential oil. 21<sup>th</sup> Iranian Conference on Optics and Photonics, 557-560.
- Marvin C. McMaster. 2007. GC/MS: A Practical User's Guide, 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc.
- Rios-Esteva, R., Turner, G.W., Lee, J.M., Croteau, R.B. and Lange, B.M. 2008. A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpene essential oil composition in peppermint. PNAS. 105 (8): 2818-2823.
- Rouessac, F. and Rouessac, A. 2013. Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques. John Wiley and Sons. Pp. 368.
- Schulz, H., Özkan, G., Baranska, M., Krüger, H. and Özcan, M. 2005. Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. Journal of Vibrational Spectroscopy, 39(2): 249-256.
- Sell, C.S. 2006. The Chemistry of fragrances from perfumer to consumer 2nd Edition. RSC publishing. UK, pp: 72-80.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R. 2017. Principles of instrumental analysis. Cengage learning. Pp. 368.
- Stashenko, E. and Martínez, J.R. 2014. Gas chromatography - mass spectrometry. In Advances in Gas Chromatography. IntechOpen. Pp. 680.



20. Stefanini, M., Ming, L., Marques, M., Facanali, R., Meireles, L., Moura, J., Marchese, M. and Sousa, L. 2006. "Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*)", *Journal of Med., Botucatu*, 8(3): 193-198.
21. Subhash, K., Bhavesh, B. and Hemang, V. 2017. Analytical method development and validation of menthol and methyl salicylate content in topical cream and gel by gas chromatography. *journal of chromatography and Technology*, 8(6): 1-4.

## Qualify investigation and detection of major constituents of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil by physical methods as an alternative to GC-MS

Jamshidian, M.<sup>1</sup>, Dehghani Bidgoli, R.<sup>2\*</sup>, Moradi, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.Sc., Department of Nanophysics, Nano Research Institute, Kashan University, Kashan, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Rangeland and Watershed Management, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Kashan University, Kashan, Iran

<sup>3</sup>Associate Professor, Department of Nanophysics, Nano Research Institute, Kashan University, Kashan, Iran

Received: 20-4-2020 Accepted: 7-11-2020

### Abstract

This article deals with evaluate the purity and detection of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil compositions using different spectrometry and refraction spectrometry and compare them with chromatography method. The conventional method for identifying and analyzing essential oils is a costly gas chromatography-coupled mass spectrometer. For this purpose, The essential oil from the aerial parts of peppermint (*Mentha piperita* L.) from the Fin city farms extracted, in the early flowering period using the Clevenger device. The main components of the essential oil were menthol, and Menton that diagnosed by gas chromatography and mass detector (GC / MS). Then using fast and low cost Raman spectroscopy method with three different spectrometers, two compounds of menthon and menthol were determined. Refractometry and FTIR spectroscopy were used to evaluate the purity of peppermint essential oil. Concentrations of 20, 30, 40, 60, 80 and 90 peppermint essential oils were manually made by cyclohexane solvent. Different concentrations and pure essential oil (concentration of 100%) were tested by Refractometry and FTIR spectroscopy. As the results show, infrared spectroscopy is not capable of quantitatively identifying the essence of pure peppermint and its diluted concentrations and is only capable of qualitatively identifying different molecules, but can be clearly distinguishable by the use of refractive index analysis of different concentrations and pure samples. Therefore, Raman spectroscopy and refractive analysis is a fast and inexpensive method capable of identifying the major constituents and determining the purity of the essential oils.

**Keywords:** Essential oil; Gas chromatography; Raman spectroscopy; Refractometer; FTIR spectroscopy

\*Corresponding author; dehghanir@kashanu.ac.ir