Comparison of physicochemical properties of peppermint (*Mentha piperita* L.) distillate obtained from dry and fresh plant in vegetative and flowering stages and in different distillate to water ration

Abstract

This study investigated effects of harvest time and distillate to plant ration (2, 4, 6, and 8 L per 1 kg fresh plant) on physiochemical characters and essential oils in the peppermint (*Mentha piperita* L.) distillate. In addition, comparisons were made between distillate resulted from dried (drying in full shade, under sunlight+shade, and total sunlight) and fresh peppermint samples. Distillation was performed using the water distillation method. Standard protocols were used to investigate the physiochemical properties of distillate. Analysis of the essential oils were done using Gas Chromatography (GC) and GC-Mass Spectrometry (GC/MS). Two-way analyses of variances showed significant effects of the harvest time and distillate to plant ration on ester no., oxidation no., iodine no., and essential oils quantity in the distillates. The highest amount of ester no. (10.8 ± 0.02) and oxidation no. (165.33 ± 70.46) was quantified in the vegetative stage and 4:1 ratio. Total amount of essential oils were higher in the flowering (37.83 ± 5.9) than the vegetative (28.25 ± 8.73) stages samples. In addition, distillates of 2:1 (35.50 ± 3.56) and 4:1 (40.33 ± 5.53) had higher essential oils than the other distillate treatments. Drying methods had significant effects on all physicochemical properties of distillates. Menthol (33.9-40.6 %) and menthone (11.3-34.9 %) were the highest components of the oils within the distillates. The results indicated the peppermint distillate may have higher quality when the plants harvested at flowering stage, dried at sunlight+shade, and distillate take at 2 and/or 4 L to 1 kg plant.

Keywords: *Industrial distillation, plant distillate; essential oils; standard quality*

مقایسه مشخصات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) حاصل از گیاه خشک و تازه در دو مرحله رویشی و زایشی و در نسبت‌های مختلف عرق به گیاه

چکیده

در این مطالعه، تأثیر مرحله برداشت (رویشی و زایشی) و نسبت حجم عرق (۲، ۴، ۶ و ۸ لیتر) به یک کیلوگرم گیاه تازه بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و اسانس موجود در عرق نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) بررسی شد. همچنین، از نعناع فلفلی خشک شده (سایه کامل، آفتاب+سایه، و آفتاب) نیز عرق تهیه شده و با گیاه تازه مقایسه شد. از روش‌های استاندارد برای تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرقیات و استخراج و اندازه‌گیری اسانس موجود در عرق استفاده شده و ترکیبات اسانس نیز توسط دستگاه‌های GC و GC/MS ارزیابی شدند. نتایج آنالیز واریانس نشان دادند که مرحله برداشت و نسبت عرق به گیاه بر عدد استری، عدد اکسایش، عدد یدی، و مقادیر اسانس عرق تأثیر معنی‌داری دارند. بیشترین مقدار عدد استری (۰/۰۲ ± ۱۰/۸) و عدد اکسایش (۷۰/۴۶ ± ۱۶۵/۳۳) در نمونه‌های قبل از گل‌دهی و برداشت با نسبت ۴ به ۱ (به‌ترتیب نسبت وزنی آب به گیاه) مشاهده شد. مقدار اسانس در نمونه‌های گل‌دار (۵/۹۰ ± ۳۷/۸۳) بیشتر از نمونه‌های قبل از گل‌دهی (۸/۷۳ ± ۲۸/۲۵) بود و حجم‌های برداشتی ۲ به ۱ (۳/۵۶ ± ۳۵/۵۰) و ۴ به ۱ (۵/۵۳ ± ۴۰/۳۳) نیز مقادیر بالاتری اسانس داشتند. روش‌های خشک کردن نیز بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق اثر داشت. منتول (۳۳/۹ – ۴۰/۶ درصد) و منتون (۱۱/۳ – ۳۴/۹ درصد) بیشترین مقدار ترکیبات موجود در عرق نعناع را در تمامی تیمارها به خود اختصاص دادند. طبق این نتایج، عرق نعناع فلفلی در مرحله گل‌دهی کامل، در نسبت برداشت عرق به گیاه ۲ و ۴ لیتر به ۱ کیلو گیاه، و خشک کردن در شرایط آفتاب+سایه از کیفیت بالاتری برخوردار است.

کلمات کلیدی: *عرق‌گیری صنعتی، عرقیات گیاهی، اسانس، کیفیت استاندارد*

مقدمه

گیاهان دارویی و ادویه‌ای به عنوان منابعی بسیار ارزشمند مطرح هستند که به طور گسترده در آشپزی، چاشنی‌های غذایی، عطرها، داروسازی، و صنعت تولید رنگ کاربرد دارند. با توجه به سابقه طولانی استفاده از این گیاهان در اغلب کشورهای دنیا، در طول قرن‌ها روش‌های مرتبط با استخراج مواد مؤثره گیاهی توسعه یافته است (Lucchesi *et al*., 2004). امروزه، بیش از ۸۰٪ جمعیت جهان از طب سنتی و گیاهان دارویی (به ویژه عصاره‌ها و اسانس گیاهان) به عنوان درمان اولیه بیماری‌ها استفاده می‌کنند (Loolaie *et al*., 2017). گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) گیاهی علفی دائمی متعلق به خانواده Lamiaceae (Labiatae) بوده که در واقع یک هیبرید طبیعی بین نعناع دشتی (*M. spicata* L.) و نعناعی آبی (*M. aquatic* L.) می‌باشد (McKay and Blumberg, 2006). اگرچه این گیاه بومی اقلیم مدیترانه‌ای است، با این حال نعناع فلفلی گیاهی است که در هر پنج قاره کشت شده و اهمیت تجاری دارد (Mokhtarikhah *et al*., 2020). این گونه گیاهی دارای خواص دارویی مختلف بوده و البته در صنایع غذایی و تولید عطر و ادکلن نیز به کار می‌رود. ارزش اقتصادی گونه‌های مختلف جنس نعناع بر اساس کمیت و کیفیت اسانس آنها مشخص می‌شود در حال حاضر داد و ستد اسانس نعناع بیش از ۴۰۰ میلیون دلار آمریکا را شامل می‌شود (Marques *et al*., 2023).

گیاه نعناع فلفلی به میزان زیاد در بین مردم به منظور درمان اختلالات گوارشی و تسکین حالات عصبی استفاده می‌شود (Loolaie *et al*., 2017). خصوصیات ضد توموری و آنتی‌باکتریال، اثرات ضد حساسیت، بهبود فعالیت‌های کلیوی داشته و گرفتگی عضلات، مشکلات گوارشی، بی‌اشتهایی، اسهال، و حالت تهوع را بهبود می‌بخشد (Keifer *et al*., 2008). به طور عمومی، از برگ‌ها به صورت خام و یا دمنوش استفاده می‌گردد؛ با این حال، مهمترین عامل کشت نعناع فلفلی حصول اسانس آن است که از طریق تقطیر سرشاخه‌های گلدار تازه یا خشک به دست می‌آید. اسانس این گیاه حاوی مقادیر بالای منتول و منتون در کنار غلظت‌های ناچیز برخی ترکیبات دیگر از قبیل منتوفوران و لیمونن است که مقادیر آنها با توجه به مرحله رشد، محل کشت و شرایط فرآوری متفاوت خواهد بود (Riachi and De Maria, 2015).

به طور کلی، اسانس حاصل از نعناع فلفلی ترکیب پیچیده‌ای از کربوهیدرات‌های مونوترپنی و سزکوئی‌ترپنی، مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌های حاوی اکسیژن، و برخی دیگر ترکیبات حاصل از متابولیسم ثانویه در گیاه هستند (Liang *et al*., 2023) که به طور فزاینده در صنایع داروسازی، غذایی، شیمیایی، و آرایشی استفاده می‌شوند. مشخص شده است که عصاره گیاه نعناع غنی از ترکیبات فنولیک است که خواص آنتی‌اکسیدانی داشته و در صنعت غذایی نیز بسیار کاربرد دارد (Ćavar Zeljković *et al*., 2021). از اسانس نعناع به طور گسترده در محصولات مختلف از قبیل خمیرهای دندان، شستشودهنده‌های دهان، عطرها و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود (Zhang *et al*., 2022).

نشان داده شده است که روش، دستگاه‌های مورد استفاده، مدت زمان در فرآیند اسانس‌گیری برای حصول بهترین نتیجه در مورد هر گونه گیاهی اختصاصی است (Marques *et al*., 2023). مطالعات گذشته بیان کرده‌اند که فاکتورهای مختلف شامل مبنای ژنتیکی، زمان و مرحله برداشت گیاه، واریته گیاه، مدت زمان و چگونگی خشک کردن گیاهان تازه‌چین، مرحله برداشت، اندام گیاهی، و حجم عرق برداشت شده پس از فرآیند تقطیر بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ترکیبات آن تأثیرگذار هستند (Kumar *et al*., 2018). در مجموع مرحله برداشت گیاهان دارویی به فاکتورهای محیطی و فیزیولوژی خود گیاه ارتباط دارد. گزارش شده است که دو الگوی همزمان در متابولیسم ثانویه گیاهان در واکنش به محرک‌های محیطی وجود دارند: واکنش‌های شدیدتر و آهسته‌تر به تغییر فصول و واکنش‌های خفیف‌تر و البته سریع‌تر به نوسان‌های آب و هوایی روزانه (Yang *et al*., 2018). با توجه به تغییرات متوالی ترکیب شیمیایی گیاه در طول زمان کوتاه، بنابراین مرحله برداشت فاکتور بسیار مهمی در تولید و خصوصیات مواد مؤثره می‌باشد (Rguez *et al*., 2019). از طرف دیگر، حجم عرق برداشتی پس از فرآیند تقطیر نیز عامل مهمی در کمیت و کیفیت آن به حساب می‌آید. اگرچه، با وجود اهمیت زیاد، این فاکتور کمتر مورد بررسی قرار گرفته است؛ با این حال، در یک مطالعه نسبتاً جدید نشان داده شده است که محتوای اسانس و مقدار بیشتر ترکیبات معطر در گل محمدی (*Rosa damascena*) در نسبت ۲ به ۱ (برداشت ۲۰۰ میلی‌لیتر عرق به ازای هر ۱۰۰ گرم

گیاه) حاصل می‌شود (Kumar *et al.*, 2018). همچنین، میزان و چگونگی خشک‌کردن اندام‌های گیاهی قبل از عملیات تقطیر بر ترکیبات نهایی اسانس اثرگذار است. به طور کلی، خشک کردن با تغییر و یا از دست رفتن ترکیبات فرار در گیاهان معطر همراه است (Akhoondi *et al.*, 2015). کاهش مقدار کلی اسانس‌ها به دنبال خشک کردن در نمونه‌های مختلف گیاهی و ادویه‌ای گزارش شده است. با این حال، برخی مطالعات نیز افزایش مقادیر برخی ترکیبات ویژه یا تشکیل ترکیبات جدید بعد از خشک کردن را گزارش نموده‌اند (Bartley and Jacobs, 2000). از این رو، میزان خشک بودن اندام گیاهی امری است که اهمیت به‌سزایی بر مواد موثره خواهد داشت. از مطالب گفته شده اینطور بر می‌آید که، مطالعات در خصوص مرحله برداشت و روش‌های اسانس‌گیری گیاه نعناع ضروری به نظر می‌رسد.

پیشینه پژوهش

از اسانس نعناع فلفلی به طور گسترده به عنوان طعم‌دهنده و رایحه در نوشیدنی‌ها، خوراکی‌ها، و دخانیات استفاده می‌شود و البته کاربردهای دارویی و آرایشی فراوان دارد (Loolaie *et al.*, 2017). مهمترین ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی شامل منتول، منتون، و منتوفوران است. در واقع، اسانس نعناع فلفلی غنی از ترکیب منتول است که در حال حاضر تنها منبع تجاری برای تولید منتول طبیعی محسوب می‌شود (Kamatou et al., 2013). گزارش شده است که اسانس نعناع خواص آنتی‌اکسیدانی (Keifer *et al.*, 2008)، و فعالیت‌های ضد میکروبی (Arakawa and Osawa, 2000) داشته و از مهمترین ترکیبات موجود در داروهای مقابله با سندرم روده تحریک‌پذیر است (Grigoleit and Grigoleit, 2005).

مشخص شده است که میزان تجمع مونوترپن‌ها (برای مثال، منتول) در نعناع فلفلی وابستگی زیادی به مرحله رشد گیاه دارد. بر این اساس، کمیت و کیفیت اسانس با مرحله رشد نعناع فلفلی در ارتباط است (Rohloff *et al.*, 2005). بیشترین مقدار اسانس و بالاترین محتوای منتول در گیاهان گل‌دار گزارش شده است (Rohloff *et al.*, 2005). همچنین، نحوه خشک‌کردن نعناع فلفلی بر ترکیبات اسانس حاصل از آن مؤثر است به طوری که گزارش شده است خشک‌کردن در درجه حرارت‌های پایین‌تر از ۵۰ °C منجر به تولید اسانس با کیفیت می‌شود (Park *et al.*, 2002).

در یک مطالعه، فرآورده‌های فرعی نعناع فلفلی از جمله عرق آن مورد بررسی قرار گرفت و سپس مؤثرترین کسر در فرمولاسیون بستنی به منظور بهبود اثرات ارتقاء سلامت شامل ظرفیت‌های آنتی اکسیدانی و مهار آلفا گلوکوزیداز بررسی شد. تجزیه و تحلیل HPLC اریوسیترین و آنالیز فنل کل نشان داد که عرق نعنا فلفلی حاوی مقدار قابل توجهی فنول پس از ۲ ساعت تقطیر با آب است. تمدید تقطیر با آب از ۱ تا ۲ ساعت تأثیری ناچیزی بر محتوای فنلی داشت. فنول غالب نعناع (اریوسیترین) ۹۱۷٫۵ میلی گرم در لیتر در عرق پس از ۱ ساعت تقطیر بود. تقطیر چهار ساعته نعناع فلفلی منجر به کاهش مقدار اریوسیترین شد، اما عرق نعنا فلفلی حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات فنولی (۸۴۰٫۱ میلی گرم در لیتر) بود (Berktas and Cam, 2021).

مطالعه دیگری نشان داده که عرق نعناع ژاپنی (*Mentha ×piperita* L.)، می‌تواند به عنوان یک عامل ضد باکتری مورد استفاده قرار گیرد. ماده اصلی موجود در این عرق، منتول بود. عرق این گونه نعناع به ترتیب اثر ضد باکتریایی عالی در برابر سویه های باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت معمولی اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد و اثر ضد باکتریایی آن حتی زمانی که عرق گیاهی تا غلظت ۵۰ درصد رقیق شده بود حفظ شد. این تحقیق نتیجه گرفته که محصول جانبی عرق گیاهی نعناع ژاپنی که عموماً به عنوان ضایعات صنعتی در نظر گرفته شده و دفع می‌شود، می‌تواند به راحتی به عنوان یک عامل ضد باکتری تجاری شود، در صورتیکه تلاش شود غلظت منتول آن در طول فرآیند استخراج اسانس ثابت بماند (Zheljazkov and Astatkie, 2012).

با توجه به سابقه استفاده گسترده عرق نعنا فلفلی در ایران از دیرباز و تأثیر فاکتورهای مختلف بر کیفیت آن، در مطالعه حاضر دو فاکتور مؤثر بر صفات کمی و کیفی عرق حاصل از گیاه نعناع فلفلی شامل مرحله برداشت و مقدار عرق برداشتی نسبت به وزن گیاه اولیه مورد سنجش قرار گرفت. گیاهان در دو مرحله قبل از گلدهی (رویشی) و گلدهی کامل (زایشی؛ باز شدن سنبله در بیش از ۵۰٪

گیاهان) نمونه‌برداری شده، و عرق آنها در حجم‌های برداشتی ۲، ۴، ۶ و ۸ (نسبت به وزن گیاه تازه قبل از تقطیر) تهیه شد. همچنین، در یک آزمایش تکمیلی، نمونه‌ها ابتدا در شرایط مختلف سایه کامل، نور خورشید + سایه، و نور خورشید خشک شده و در نسبت حجمی/وزنی ۶ به ۱ (عرق به گیاه اولیه) در رابطه با فاکتورهای فیزیکوشیمیایی سنجش شدند. انتظار می‌رود که با تغییر این فاکتورها، کیفیت ترکیبات شیمیایی اسانس و خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی متفاوت باشد.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی

کشت گیاه نعناع فلفلی در مزرعه تحقیقاتی زیبادشت کرج انجام شد. قبل از عملیات کشت، از خاک محل اجرای آزمایش در آزمایشگاه خاک شناسی موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور نمونه‌برداری گردیده و سپس کلیه عملیات زراعی بر حسب نتایج خصوصیات خاک انجام گردید (جدول ۱) همچنین گیاه نعناع فلفلی به شکل استولن از مرکز معتبر شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و استولن‌ها در ۵ کرت به ابعاد ۵ در ۱۰ متر مربعی کشت شدند. همچنین، فواصل بین بوته‌ها ۳۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد و بلافاصله بعد از کاشت آبیاری انجام یافت، کنترل علف‌های هرز به محض ظهور و در طول رشد نعناع به روش دستی صورت گرفت.

جدول ۱- خصوصیات خاک مورد استفاده برای کشت نعناع فلفلی در مطالعه حاضر

pH	EC (ds/m)	شن	سیلت	رس	مواد آلی	نیتروژن	P	K	Fe	Zn	Mn
		(%)				(mg/kg)					
۷/۸	۱/۶	۶۶/۷	۱۴/۵	۱۸/۸	۰/۹	۰/۵	۴۴	۱۲۰	۶/۷	۰/۸	۲/۶

فرآیند تقطیر و تیمارهای آزمایش

سرشاخه سبز گیاهان (یا اندام های هوایی گیاهان) در ابتدای صبح عملیات تقطیر برداشت شدند. عرق گیری با روش تقطیر با آب انجام گرفت. سیستم سردکننده دستگاه تقطیر دمای آب را در طول فرآیند در ۱۳ °C حفظ نمود (Marques et al., 2023). در هر نمونه‌گیری، مقدار ۱ کیلوگرم ماده گیاهی توزین شده و با ۱۲ لیتر آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس حرارت داده شد تا مخلوط آب و گیاه به جوش آمد. بخارات آب و اسانس گیاهی وارد مبرد (condenser) شده و پس از سرد شدن در قسمت جمع‌آوری خروجی عرق و اسانس (reviver) جمع‌آوری شدند. برای آزمایشات مختلف به محض رسیدن به حجم مورد نظر از عرق (distilate)، دستگاه خاموش شد. ابتدا اسانس جمع آوری شده از روی عرق نعنا برداشته شده و سایر آزمونها بر روی عرق نعنا انجام شدند.

به منظور بررسی تأثیر مرحله برداشت بر خصوصیات عرق نعناع، دو تیمار مختلف شامل ۱- برداشت قبل از گل‌دهی (رویشی) و ۲- برداشت در مرحله گل‌دهی کامل (زایشی) ترتیب داده شد. همچنین، از نمونه‌های عرق حاصل در چهار مقدار متفاوت نمونه‌گیری به عمل آمد تا تأثیر نسبت عرق حاصل به مقدار گیاه اولیه بر خصوصیات و ترکیبات عرق اندازه‌گیری شود. این چهار تیمار شامل نسبت‌های ۲ به ۱، ۴ به ۱، ۶ به ۱، و ۸ به ۱ (مقدار حجم عرق برداشت شده به گیاه مورد استفاده) بودند. تمامی تیمارهای آزمایشی شامل سه تکرار بودند.

همچنین، در یک آزمایش تکمیلی و به منظور سنجش نحوه خشک کردن بر ترکیبات نهایی عرق، از نمونه‌های قبل از گل‌دهی و گل‌دهی کامل استفاده شده و در سه تیمار مختلف شامل ۱- خشک کردن کامل در سایه، ۲- خشک کردن کامل زیر نور خورشید،

و ۳- خشک کردن ابتدا زیر نور خورشید (۳ساعت در آفتاب) و سپس در سایه تست شدند. کیفیت و شاخص‌های عرق حاصل از این تیمارها تنها در نسبت ۶ به ۱ سنجش شدند.

تعیین کیفیت عرق

عرق نعناعی حاصل از هر نمونه برای بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ترکیبات بیوشیمیایی آزمون گردید. این ارزیابی‌ها شامل برآورد تراکم نسبی (چگالی)، مقدار pH، عدد اسیدی، عدد استری، عدد اکسایش، عدد یدی، مقدار و ترکیبات اسانس بودند.

چگالی عرق نعناع با استفاده از پیکنومتر شیشه‌ای (دقت $\pm 5 \times 10^{-4}$ g/cm^3) در دمای ۲۰ °C صورت گرفت. قبل از استفاده، پیکنومتر به دقت تمیز شده، خشک شده و توزین گردید. تراکم نسبی بر مبنای نسبت وزن یک حجم مشخص عرق نعناع در ۲۰ °C بر حجم مشابه آب در دمای مشابه و بر طبق رابطه ۱ اندازه‌گیری شد (Chen and Wang, 2021).

رابطه ۱)
$$p = \frac{M3 - M1}{M2 - M1}$$

در این رابطه، M1: وزن (گرم) پیکنومتر خالی در ۲۰ °C؛ M2: وزن (گرم) پیکنومتر حاوی آب در ۲۰ °C؛ M3: وزن (گرم) پیکنومتر حاوی عرق نعناع در ۲۰ °C می‌باشد.

مقدار pH عرق نعناع با استفاده از یک دستگاه سنجش pH (مدل WTW InoLab Cond 720) اندازه‌گیری شد.

به منظور تعیین عدد اسیدی نمونه‌های عرق، مقدار ۵۰ ml نمونه به یک فلاسک ارلن‌مایر ۲۵۰ ml منتقل شد. سپس، محتوای ارلن‌مایر با استفاده از محلول ۰/۰۱ نرمال هیدروکسید سدیم در حضور فنول‌فتالئین (به عنوان شاخص اسید-باز) برای رسیدن به رنگ صورتی مات تیتر گردید. عدد اسیدی بر مبنای رابطه ۲ محاسبه شد.

رابطه ۲)
$$A = \frac{V \times 0.6}{50} \times 100$$

که در اینجا A: بیانگر عدد اسیدی بر مبنای اسید استیک (mg/100 ml) بوده، و V: حجم هیدروکسید سدیم مصرف شده (ml) می‌باشد.

برای تعیین عدد استری، ۱۰۰ ml نمونه عرق به یک ارلن‌مایر ۲۵۰ ml اضافه شده و در ادامه محتوای ارلن‌مایر با استفاده از محلول ۰/۰۱ نرمال هیدروکسید سدیم در حضور فنول‌فتالئین برای رسیدن به رنگ صورتی مات تیتر گردید. در ادامه، ۱۰ ml محلول هیدروکسید سدیم دیگر به ارلن اضافه شده، درب آن بسته شده و در بن‌ماری با دمای ۹۰ °C به مدت ۲ ساعت حرارت داده شد تا تمامی استرها صابونی شوند. در انتهای واکنش، محتوای ارلن تا رسیدن به دمای اتاق سرد شده و با کمک محلول اسید هیدروکلریک ۰/۰۲ نرمال تا رسیدن به رنگ صورتی مات تیتر شد. یک تست کنترل در شرایط کاملاً مشابه با استفاده از آب مقطر نیز صورت گرفت. عدد استری در نهایت با کمک رابطه ۳ محاسبه گردید.

رابطه ۳)
$$S = 2 \times (B - A)$$

در این رابطه، S: عدد استری؛ A: حجم (ml) اسید هیدروکلریک استفاده شده در تست کنترل؛ B: حجم (ml) اسید هیدروکلریک استفاده شده در تست نمونه عرق می‌باشد.

برای تعیین عدد اکسایش نمونه‌های عرق، ، مقدار ۵۰ ml نمونه به یک ارلن‌مایر ۲۵۰ ml منتقل شد. سپس، ۱۰ ml اسید سولفوریک محلول و ۱۵ ml پرمنگنات پتاسیم ۰/۱ نرمال به ارلن اضافه شدند. درب ارلن‌مایر بسته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک نگهداری شد. در ادامه، ۱۰ ml محلول ۱۰٪ پتاسیم یدید و چند قطره محلول نشاسته به محتوای ارلن اضافه شده و با استفاده

از محلول ۰/۱ نرمال تیوسولفات سدیم تا از بین رفتن کامل رنگ محتوا تیتر گردید. یک تست کنترل در شرایط کاملاً مشابه با استفاده از آب مقطر نیز صورت گرفت. عدد اکسایش در نهایت با کمک رابطه ۴ محاسبه گردید.

$$X = 20 \times (B - A)$$ رابطه ۴)

در این رابطه، X: عدد اکسایش؛ A: حجم (ml) تیوسولفات سدیم استفاده شده در تست نمونه عرق؛ و B: حجم (ml) تیوسولفات سدیم مصرف شده در تست کنترل است.

برای تعیین عدد یدی، مقدار ۵۰ ml نمونه به یک ارلن‌مایر ۲۵۰ ml منتقل شده و pH آن با استفاده از محلول ۰/۰۱ نرمال هیدروکسید سدیم خنثی شد. سپس، ۱۰ ml هیدروکسید سدیم و ۱۰ ml محلول ید نیز به ارلن اضافه شدند. درب ارلن‌مایر بسته شده و به مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریک نگهداری شد. در ادامه، ۱۰ ml محلول اسید سولفوریک و چند قطره محلول نشاسته به محتوای ارلن اضافه شده و با استفاده از محلول ۰/۰۲ نرمال تیوسولفات سدیم تا از بین رفتن کامل رنگ محلول تیتر گردید. یک تست کنترل در شرایط کاملاً مشابه با استفاده از آب مقطر نیز صورت گرفت. عدد یدی با کمک رابطه ۵ محاسبه گردید.

$$X = 4 \times (B - A)$$ رابطه ۵)

در این رابطه، X: عدد یدی؛ A: حجم (ml) تیوسولفات سدیم استفاده شده در تست نمونه عرق؛ و B: حجم (ml) تیوسولفات سدیم مصرف شده در تست کنترل است.

مقادیر اسانس در نمونه‌های عرق با روش پنتان تعیین شد (Heravi and Sereshti, 2007). برای این منظور، ۲۵۰ ml از نمونه به یک بشر ۵۰۰ ml انتقال یافته و سپس ۳۳ ml ان–پنتان و ۵۰ g کلرید سدیم به آن اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه کاملاً هم‌زده شد. پس از خروج گازهای فرار، محتوای درون بشر به یک قیف جداکننده وارد شد و دو فاز آبی و روغنی جدا شدند. فاز آبی در ادامه تخلیه شده و محتوای روغنی به درون یک ارلن از قبل توزین شده وارد گردید و سپس در دستگاه روتاری قرار داده شد. در نهایت ارلن دوباره وزن شده و مقادیر اسانس براساس رابطه ۶ اندازه‌گیری شد.

$$S = (A - B) \times 0.53 \times 1000$$ رابطه ۶)

در این رابطه، S: مقدار اسانس (mg/100 ml)؛ A: وزن (g) ارلن حاوی اسانس؛ و B: وزن (g) ارلن فاقد اسانس است.

آنالیز ترکیبات اسانس

ترکیبات اسانس در نمونه‌های عرق نعناع فلفلی با استفاده از کروماتوگرافی گازی (Shimadzu GC-9A) مطابق با ISO (No. 22448) و کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (Varian-3400 GC/MS) در آزمایشگاه تجزیه دستگاهی بخش تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور اندازه‌گیری شد.

دستگاه GC به یک ستون DB-5 (به طول ۳۰ m، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ mm، و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ µm) مجهز بوده و دارای آشکارساز یونش شعله (FID) بود. برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه نیز از ۴۰ تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش ۳ °C در دقیقه بود. دمای آون دستگاه در ابتدا و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰ °C تنظیم شد و سپس با نرخ ثابت ۳ درجه در دقیقه به ۲۴۰ °C افزایش یافت. درجه حرارت آشکارساز در ۲۶۰ °C تنظیم شد و دمای ناحیه تزریق نیز ۲۵۰ °C بود. همچنین، گاز حامل نیز هلیوم و با جریان ۳۲ سانتی‌متر در ثانیه بود.

ستون دستگاه GC/MS و برنامه‌ریزی حرارتی آن نیز مطابق با ستون GC بود. دمای محفظه تزریق ۱۰ درجه بیشتر از دمای نهایی ستون تنظیم شد. گاز حامل هلیوم بود که با سرعت ۳۱/۵ سانتیمتر بر ثانیه در طول ستون حرکت میکرد. زمان اسکن برابر یک ثانیه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ۴۰ تا ۳۴۰ a.m.u بود. درصد حجمی هر ترکیب با استفاده از داده‌های FID با

ویراستاری نشده

تکنیک نرمال‌سازی ناحیه بدست آمد و شناسایی ترکیبات با مقایسه طیف جرمی آن با داده‌های استاندارد دستگاه (Adams and Wiley 7.0) و محاسبه شاخص‌های بازداری تعیین گردید (Akhoondi et al., 2015).

طرح آزمایشی و آنالیز داده‌ها

طرح‌های آزمایشی به کار گرفته شده در تحقیق حاضر، طرح‌های نمونه‌برداری بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی بودند. همگن بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Levene's test برآورد شد؛ تمامی داده‌ها توزیع نرمال داشتند. از آزمون واریانس دو–طرفه برای سنجش اثرات مرحله برداشت و نسبت عرق به گیاه بر خصوصیات و ترکیبات عرق استفاده شد. همچنین، تأثیر نحوه خشک کردن نمونه‌های گیاهی در دو مرحله برداشت بر ترکیبات عرق نیز با استفاده از آزمون واریانس دو–طرفه سنجش شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. تمامی آنالیزها با نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۲ در سطح معنی‌داری $P \leq ۰/۰۱$ انجام شد.

نتایج

عرق نعناع فلفلی به دست آمده در مطالعه حاضر در تمامی آزمایش‌ها، شفاف تا کمی کدر بود. نتایج آماری از آزمون واریانس دو–طرفه با مرحله برداشت و نسبت عرق به گیاه به عنوان متغیرهای اصلی و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی عرق نعناع به عنوان متغیرهای وابسته در جدول ۲ بیان شده است. به استثنای مقادیر pH و عدد اسیدی، دیگر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های عرق نعناع فلفلی از مرحله برداشت گیاه تأثیر معنادار گرفتند. به دنبال فرآیند تقطیر، آنالیز داده‌ها نشان دادند که برداشت ۲ لیتر (نسبت ۲ به ۱)، ۴ لیتر (نسبت ۴ به ۱)، ۶ لیتر (نسبت ۶ به ۱)، و ۸ لیتر (نسبت ۸ به ۱) عرق نعناع فلفلی تأثیر معنادار آماری بر مقادیر تمامی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی عرق داشته است. همچنین، اثر متقابل متغیرهای اصلی آزمایش اثر معناداری بر شاخص‌ها، به استثنای تراکم نسبی عرق داشتند (جدول ۲).

جدول ۲– جدول تجزیه واریانس دو–طرفه بین مراحل برداشت و حجم عرق برداشتی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی

متغیرها	درجه آزادی	شاخص‌های فیزیکوشیمیایی						
		عدد اسیدی (mg CH3COOH/100 ml)	pH	عدد استری	تراکم نسبی	عدد اکسایش	عدد یدی	مقدار اسانس (mg/100 ml)
مرحله برداشت	۱	۰/۰۰۱	۰/۰۴	۳۷/۱۵ **	۰/۱۳۷	۴۵۸۸/۶ **	۸۰۶/۱ *	۱۹۰/۴۴ **
حجم عرق	۶	۱/۵۶۸	۰/۷۶	۳۰/۰۰ **	۰/۰۸۴	۱۹۷۳۴/۸ **	۳۱۷۴/۵ **	۷۶۶/۷۸ **
مرحله برداشت × حجم عرق	۶	۰/۰۶۲	۰/۱۹۴	۶/۷۱ **	۰/۰۲۷	۲۶۷۳/۹ **	۱۳۷۷/۴ **	۷۸۱/۵۷ **
ضریب تغییرات		۸/۲۸	۳/۲۱	۱۹/۱۲	۰/۱۳	۱۴/۱۸	۱۱/۴۸	۲/۴۹

* $p < ۰/۰۵$ و ** $p < ۰/۰۱$

نتایج تفاوت خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی حاصل از نمونه‌های قبل از گل‌دهی و گل‌دهی کامل فارغ از حجم برداشتی عرق در جدول ۳ ارائه شده است. اندازه‌گیری‌ها نشان دادند که عدد اکسایش و عدد یدی عرق حاصل از نمونه‌های رویشی

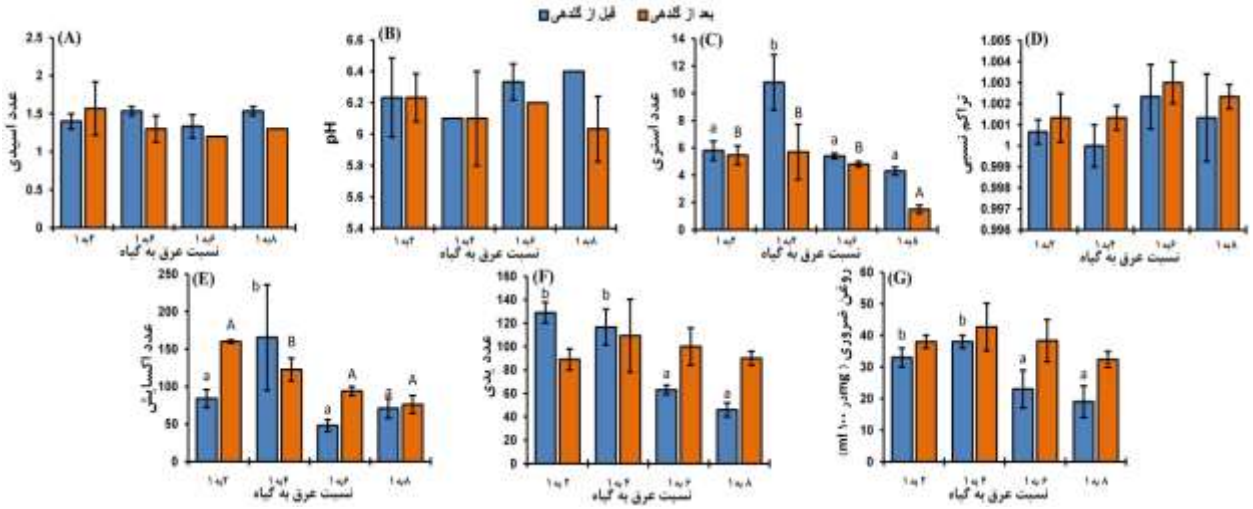
(قبل از گل‌دهی) کمتر از این مقادیر در نمونه‌های مرحله گل‌دهی می‌باشند. به طور برعکس، عدد استری و مقدار اسانس نمونه‌ها در مرحله برداشت قبل از گل‌دهی بیش از این مقادیر در نمونه‌های گل‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۳- جدول مقایسه میانگین‌ها بین مراحل مختلف برداشت در گیاه نعناع فلفلی

	عدد اسیدی (mg CH3COOH/100 ml)	pH	عدد استری	تراکم نسبی	عدد اکسایش	عدد یدی	مقدار اسانس (mg/100 ml)
قبل از گل‌دهی	۱/۸۰	۵/۹۴	۷/۰۶ [b]	۱/۰۰۲	۱۳۳/۱۴ [a]	۹۴/۷۶ [a]	۳۵/۲۸ [a]
گل‌دهی کامل	۱/۷۹	۶/۰۰	۵/۱۸ [a]	۱/۰۰۳	۱۵۴/۰۵ [b]	۱۰۳/۵۲ [b]	۳۹/۸۸ [b]

حروف لاتین غیر مشترک نشان از تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ است.

عدد اسیدی نمونه‌های عرق حاصل از مرحله قبل از گل‌دهی ($p = ۰/۰۹۵$؛ $F_{3,11} = ۳/۰۰$) و گل‌دهی کامل ($p = ۰/۲۰۳$؛ $F_{3,11} = ۱/۹۳$) تفاوت معناداری در بین حجم‌های برداشتی عرق نداشتند (نمودار A۱). همچنین، pH نمونه‌ها در قبل و گلدهی کامل بین حجم‌های برداشتی عرق تفاوتی نداشتند (نمودار B۱). با این حال، تفاوت معنادار آماری بین حجم‌های برداشتی عرق در عدد استری نمونه‌ها در هر دو مرحله قبل از گل‌دهی ($p < ۰/۰۰۱$؛ $F_{3,11} = ۲۱/۱۴$) و گل‌دهی کامل ($p < ۰/۰۵$؛ $F_{3,11} = ۶/۷۸$) مشاهده شد. بیشترین مقادیر عدد استری در مراحل قبل و گل‌دهی کامل در تیمار ۴ لیتر اندازه‌گیری شد (نمودار C۱). با وجود کمتر بودن تراکم نسبی عرق نعناع فلفلی در حجم‌های برداشت ۲ و ۴ لیتر، هیچ تفاوت معناداری بین تیمارها در مرحله رویشی ($F_{3,11} = ۲/۶۶$) و زایشی ($F_{3,11} = ۱/۴۸$) مشاهده نشد ($p> ۰/۰۵$؛ نمودار D۱). نمونه‌های گیاه نعناع فلفلی قبل از گل‌دهی منجر به تفاوت معنادار در عدد اکسایش عرق در بین حجم‌های برداشتی شد ($p < ۰/۰۵$؛ $F_{3,11} = ۵/۸۵$). همچنین، تفاوت معنادار بسیار واضح در نمونه‌های گل‌دهی کامل مشاهده شد ($p < ۰/۰۰۱$؛ $F_{3,11} = ۳۹/۰۲$) (نمودار E۱). در رابطه با مقدار عدد یدی، تفاوتی در بین حجم‌های برداشتی عرق گلدهی کامل نمونه‌ها مشخص نشد ($p > ۰/۰۵$؛ $F_{3,11} = ۰/۸۱۹$)؛ اگرچه، عدد یدی تیمارهای حجمی عرق در نمونه‌های قبل از گل‌دهی تفاوت معناداری بروز دادند ($p < ۰/۰۰۱$؛ $F_{3,11} = ۵۳/۳۹$) به صورتی که با افزایش نسبت عرق برداشتی عدد یدی کاهش پیدا کرد (نمودار F۱). همچنین، مقدار اسانس موجود در حجم‌های مختلف برداشت عرق در نمونه‌های حاصل از قبل از گل‌دهی ($p < ۰/۰۱$؛ $F_{3,11} = ۱۲/۴۷$) تفاوت معنادار داشتند؛ اما در مرحله گل‌دهی کامل ($p > ۰/۰۵$؛ $F_{3,11} = ۱/۹۴$) تفاوتی بروز ندادند. به طور کلی، مقادیر اسانس در حجم‌های برداشتی کمتر عرق، بیشتر از سایر تیمارها بود (نمودار G۱).



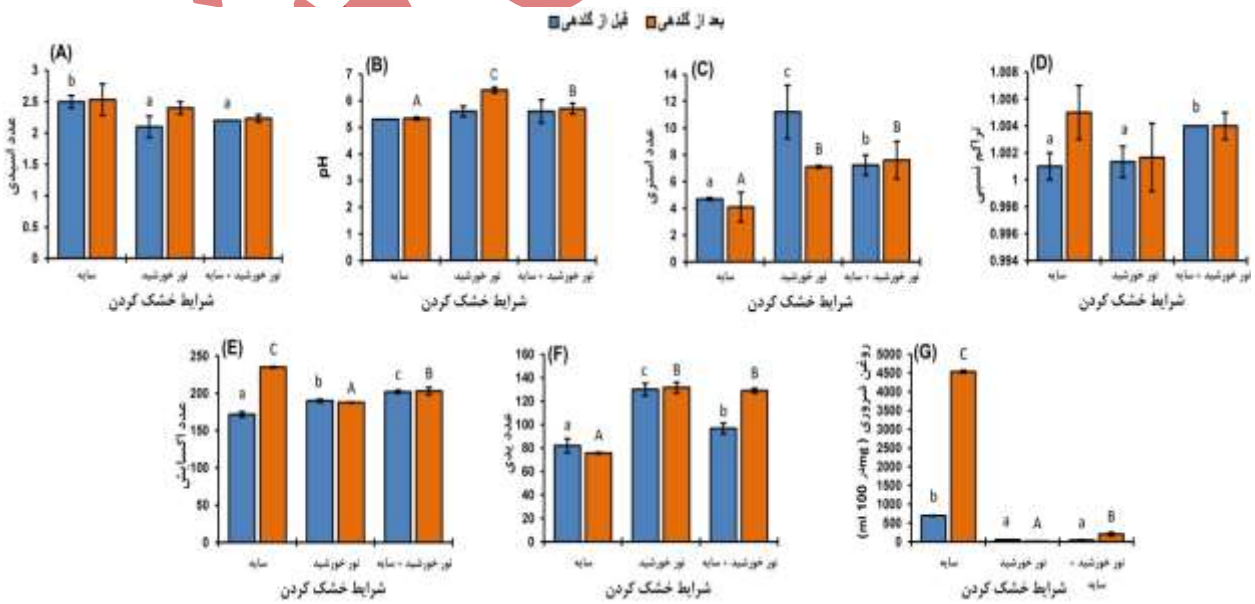
نمودار ۱– خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی در دو مرحله برداشت (قبل و گلدهی کامل) و چهار سطح میزان عرق نسبت به ماده اولیه (۲، ۴، ۶ و ۸ برابر).
حروف لاتین غیر مشترک نشان از تفاوت معنادار است (حروف کوچک برای مرحله قبل از گل‌دهی، و حروف بزرگ برای گل‌دهی کامل)

نمونه‌های دیگری از گیاه نعناع فلفلی در دو مرحله برداشت رویشی و زایشی برداشت شده و در شرایط مختلف خشک شدند. خصوصیات عرق حاصل از این آزمایش در نسبت ۶ به ۱ بررسی شد. نتایج آزمون واریانس چند متغیره حاکی از تأثیرات معنادار مراحل برداشت گیاه (آزمون Wilk's Lambda؛ $p < ۰/۰۰۱$؛ $F = ۱۵۲۴/۴۵$)، روش‌های خشک‌کردن (آزمون Wilk's Lambda؛ $p < ۰/۰۰۱$؛ $F = ۲۶۶/۷۸$) و تقابل این دو عامل (آزمون Wilk's Lambda؛ $p < ۰/۰۰۱$؛ $F = ۱۶۹/۵۵$) بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق بود (جدول ۴).

جدول ٤– جدول تجزیه واریانس دو–طرفه بین مراحل برداشت و نحوه خشک کردن بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی

متغیرها	درجه آزادی	شاخص‌های فیزیکوشیمیایی						
		عدد اسیدی	pH	عدد استری	تراکم نسبی	عدد اکسایش	عدد یدی	مقدار اسانس
مرحله برداشت	۱	۳/۴۵	۹/۲۲ **	۷/۲۷ *	۴/۱۲	۲۴۷/۱۱ **	۲۱/۰۶ **	۱۲۶۵۰/۷۱ **
نحوه خشک کردن	۲	۸/۳۴ **	۱۴/۸۳ **	۲۶/۸۶ **	۴/۱۷ *	۵۱/۱۳ **	۲۳۰/۳۱ **	۲۰۷۷۲/۰۲ **
مرحله برداشت × نحوه خشک کردن	۲	۱/۸۲	۵/۷۲ *	۶/۴۱ *	۳/۲۴	۲۶۳/۸۵ **	۳۴/۳۹ **	۱۱۵۶۰/۰۶ **

نتایج نشان دادند که در هر دو حالت برداشت، خشک کردن کامل در سایه با افزایش معنادار اسانس و کاهش معنادار عدد استری و یدی همراه است (نمودار ۲). از طرف دیگر، خشک کردن کامل زیر نور خورشید منجر به بیشتر بودن pH، عدد استری و عدد یدی نمونه‌های عرق شد. بیشترین مقادیر عدد اکسایش و اسانس در عرق حاصل از نمونه‌های گل‌دار و خشک شده در سایه مشاهده شد. همچنین، خشک کردن نمونه‌ها ابتدا زیر نور خورشید و سپس در سایه نیز باعث بیشتر بودن مقدار اسانس نسبت به خشک کردن کامل زیر نور خورشید گردید (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقادیر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی در دو مرحله برداشت (قبل و گلدهی کامل) و سه شرایط خشک کردن (در سایه، در نور خورشید، و ۳ ساعت در نور خورشید + سایه)

حروف لاتین غیر مشترک نشان از تفاوت معنادار است (حروف کوچک برای مرحله قبل از گل‌دهی، و حروف بزرگ برای گل‌دهی کامل)

نتایج حاصل از آزمون‌های کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنج جرمی منجر به شناسایی ۲۱ ترکیب شد که درصد آنها در ارتباط با مرحله برداشت گیاه و روش خشک‌کردن متفاوت بود. نتایج این آزمون‌ها در جدول ۵ ارائه شده است. همچنین، درصد اسانس به دست آمده در مطالعه حاضر در جدول ۶ نشان داده شده است. تمامی درصدهای حاصل بیش از ۱٪ بوده و البته به استثنای شرایط خشک کردن کامل در سایه، مقادیر اسانس برای نمونه‌های گل‌دار به طور معناداری بیشتر از نمونه‌های قبل از گل‌دهی بود. همچنین، نتایج نشان دادند که خشک کردن اندام‌های گیاهی در سایه می‌تواند با افزایش میزان اسانس همراه باشد (جدول ۶).

جدول ۵- ترکیبات شیمیایی اسانس عرق نعناع فلفلی براساس مراحل برداشت و نحوه خشک کردن

ترکیبات	شاخص بازداری (RI)	خشک کردن در سایه		خشک کردن در نور خورشید		خشک کردن در نور + سایه	
		قبل از گل‌دهی	گل‌دهی کامل	قبل از گل‌دهی	گل‌دهی کامل	قبل از گل‌دهی	گل‌دهی کامل
		(٪)					
α-pinene	939	۰/۸	۱/۴	۰/۸	۱/۰	۰/۶	۰/۸
Sabinene	976	۰/۷	۰/۹	۰/۶	۰/۷	۰/۴	۰/۶
β-pinene	983	۱/۳	۱/۹	۱/۲	۱/۵	۰/۹	۱/۲
myrcene	988	–	–	–	–	۰/۲	۰/۲
1,8-cineol	1034	۲/۳	۳/۷	۲/۰	۳/۱	۲/۷	۲/۹
Z-β-ocimene	1039	۷/۸	۸/۴	۷/۶	–	۴/۹	۶/۷
γ-terpinene	1062	–	–	۰/۴	–	۰/۲	۰/۲
terpinolene	1075	۱/۴	۱/۱	۱/۶	۱/۳	۱/۳	۱/۲
linalool	1100	–	–	۰/۳	–	–	۰/۲
menthone	1152	۳۴/۹	۱۱/۳	۳۱/۰	۲۴/۱	۲۷/۵	۱۷/۲
iso-menthone	1157	۲/۵	۸/۱	۱/۲	۶/۴	۸/۷	۷/۳
menthofurane	1159	۴/۴	۲/۷	۳/۴	۳/۷	۳/۴	۲/۹
neomenthol	1161	۲/۵	۳/۴	۳/۰	۳/۱	۲/۶	۳/۴
menthol	1171	۳۳/۹	۴۰/۶	۳۸/۰	۳۷/۵	۳۶/۶	۳۹/۳
terpinen-4-ol	1176	۰/۴	۰/۸	۰/۷	۰/۵	۰/۵	۰/۸
pulegone	1244	۰/۷	۱	۰/۴	۱/۱	۱/۷	۱/۲
piperitone	1273	–	۰/۷	–	–	–	۰/۵
menthyl acetate	1291	۲/۴	۹/۳	۲/۵	۶/۲	۴/۶	۸/۷
isomenthyl acetate	1304	–	۰/۵	–	–	–	۰/۴
E-caryophyllone	1422	۱/۴	۱/۶	۱/۹	۱/۱	۱/۲	۱/۸
spathulenol	1482	۱/۴	۱/۴	۲/۱	۰/۷	۱/۲	۱/۵
مجموع (٪)		۹۸/۸	۹۸/۸	۹۸/۷	۹۲	۹۹/۲	۹۹
منوترپنهای هیدروکربنی (٪)		۱۴/۳	۱۷/۴	۱۴/۲	۷/۶	۱۱/۲	۱۳/۸
منوترپنهای اکسیژن دار (٪)		۸۱/۷	۷۸/۴	۸۱/۵	۸۲/۶	۸۵/۶	۸۱/۹
سزکوئی ترپنها (٪)		۲/۸	۳	۳	۱/۸	۲/۴	۳/۳

جدول ٦- میانگین درصد اسانس (اسانس) در نمونه‌های نعناع فلفلی خشک‌شده در شرایط مختلف حاصل از دو مرحله برداشت در روش کلونجر

خشک کردن در سایه	خشک کردن در نور خورشید	خشک کردن در نور + سایه

قبل از گل‌دهی	گل‌دهی کامل	قبل از گل‌دهی	گل‌دهی کامل	قبل از گل‌دهی	گل‌دهی کامل
۱/۹۲	۱/۹۶	۱/۴۳	۱/۸۴	۱/۳۲	۱/۹۰

بحث

عرق نعناع فلفلی به عنوان یک ماده غذایی–دارویی مطرح است که فواید سلامتی بالایی داشته و ارزش تجاری آن زیاد است (Marques *et al.*, 2023). بنابراین، تعیین شرایط بهینه برای دستیابی به عرق باکیفیت و حاوی مقادیر کافی اسانس ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر، برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی از مرحله برداشت گیاه (قبل از گل‌دهی و گلدهی کامل کامل) و نسبت برداشت عرق بعد از تقطیر به ماده اولیه (۲، ۴، ۶، ۸) تأثیر گرفتند. همچنین، مقدار و کیفیت اسانس عرق نیز متناسب با مرحله برداشت و روش‌های مختلف خشک کردن، تغییر داشت.

اسیدیته نمونه‌های عرق نعناع فلفلی در دو شکل pH و عدد اسیدی هیچ تفاوتی در بین تیمارهای مختلف آزمایشی نداشتند. این امر به معنای عدم تأثیر مرحله برداشت و برداشت حجم‌های مختلف عرق بر خواص اسیدی عرق حاصل است. به طور کلی، مقدار استاندارد pH و عدد اسیدی برای عرق نعناع فلفلی به ترتیب در دامنه ۵/۴–۴/۶ و ۴/۳–۱/۲ است که بر این اساس مقادیر به دست آمده در آزمایش حاضر در دامنه استاندارد قرار داشتند.

استری شدن فرآیندی است که در آن یک گروه الکلی توسط یک استر با یک گروه الکل دیگر جابه‌جا می‌شود. این استرها در عصاره‌های گیاهی تقریباً به مقدار ۹۰–۹۵٪ گلیسیریدها هستند که در اصل استر گلیسرول و اسیدهای چرب می‌باشند (Dmytryshyn et al., 2004). میانگین عدد استری نمونه‌های عرق در مطالعه حاضر دامنه‌ای بین ۱/۵ تا ۱۰/۸ داشت که به استثنای عرق حاصل از نمونه گلدهی کامل و حجم برداشتی ۸ (۰/۵ ± ۱/۵)، عدد استری در تمامی تیمارهای دیگر در دامنه استاندارد (۲/۸ تا ۱۰/۸) قرار داشت.

مقدار مقاومت به فرآیند اکسایش تعیین‌کننده دوام، قابلیت استفاده، و همگن بودن یک عرق گیاهی و ترکیبات آن است. به طور کلی، نیمه عمر هر محصول غذایی به مقاومت اکسایشی چربی‌های موجود در آن بستگی دارد (Szterk *et al.*, 2010). عموماً، محصولات غذایی حاوی چربی‌های غیر اشباع، عدد اکسایش کمتری دارند و بنابراین فرآیند فساد در آنها سریع‌تر رخ می‌دهد. از طرف دیگر، مشخص شده است که مرحله زندگی گیاه بر مقادیر متابولیت‌های ثانویه آن مؤثر است (Zhao *et al.*, 2023). عدد اکسایش در مطالعه حاضر از مرحله برداشت گیاه، مقدار عرق برداشتی، و تقابل این دو عامل تأثیر معنادار گرفته بود. مقادیر مقاومت اکسایشی در حجم‌های برداشتی ۲ و ۴ به مراتب بالاتر از دیگر تیمارها بود. این امر به وضوح نشان می‌دهد که برداشت عرق نعناع فلفلی در حجم کمتر، کیفیت اکسایش بالاتری دارد.

عدد یدی عرق‌های گیاهی بسیار با اهمیت است چرا که نشان‌دهنده درجه اشباعیت آنها می‌باشد. درجه اشباعیت عرق به میزان زیاد بر اکسیداسیون ذرات، طول عمر عرق، و ذرات قابل رسوب در ظرف حاوی عرق مؤثر است (Kaya *et al.*, 2009). براساس استاندارد، عدد یدی عرق نعناع فلفلی می‌بایست حداقل ۵۰ باشد. در مطالعه حاضر، مرحله برداشت گیاه، حجم برداشتی عرق، و تقابل این دو عامل تأثیر معناداری بر عدد یدی داشتند. میانگین عدد یدی تنها در نمونه‌های قبل از گل‌دهی و حجم برداشتی ۸ کمتر از ۵۰ بود. با این حال، تمامی نمونه‌ها در مرحله گل‌دهی کامل عدد یدی مناسبی داشتند.

تعداد ۲۱ ترکیب شیمیایی در نمونه‌های خشک شده در آفتاب + سایه اندازه‌گیری شد؛ در حالی که این تعداد برای سایر تیمارهای خشک‌کردن بین ۱۵ تا ۱۸ ترکیب بود. در واقع تعداد ترکیبات اسانس در تیمارهای خشک کردن کامل در سایه یا آفتاب یکسان بوده و تعداد بیشتری برای برقراری همزمان آفتاب + سایه تایید شد. این امر نشان می‌دهد که مدت زمان برقراری شرایط نوری برای خشک شدن اندام‌های گیاه نعناع فلفلی در مطالعه حاضر اهمیت داشته است. هیچ ارتباط قابل تعمیم بین نحوه خشک کردن گیاه و مقدار و ترکیبات اسانس گیاهان معطر وجود ندارد. برخی مطالعات ذکر کرده‌اند که افزایش درجه حرارت در طول خشک شدن باعث کاهش

(Akhoondi *et al.*, 2015) و برخی دیگر گزارش داده‌اند که موجب افزایش (Sefidkon *et al.*, 2006) مقدار و تنوع ترکیبات اسانس می‌شود. تنها نکته‌ای که تمامی مطالعات بر آن اتفاق دارند این است که در فرآیند تقطیر، گیاه خشک شده به مقادیر بیشتر و ترکیبات متنوع‌تر نسبت به گیاه تازه منجر می‌شود (Sellami *et al.*, 2011). بهرحال، مطالعه ما نشان داد که در نعناع فلفلی درجه حرارت بالاتر در ابتدای پروسه خشک شدن (زیر آفتاب) و سپس کاهش درجه حرارت (در سایه) می‌تواند مقدار قابل ملاحظه (۱/۹۰٪ در نمونه‌های گل‌دار) و بیشترین تعداد ترکیبات (۲۱ عدد) را بروز دهد.

ترکیبات به دست آمده حاصل از آزمایش‌های کروماتوگرافی شامل مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و بدون اکسیژن، و سس‌کوئی‌ترپن-های اکسیژن‌دار و بدون اکسیژن بود. مقایسه مجموع درصد منوترپن‌های هیدروکربنی و اکسیژن دار و همچنین سزکوئی ترپنها در اسانس موجود در عرق نعنا در مراحل مختلف برداشت و نحوه خشک کردن (جدول ۵) نشان داد که در روش خشک‌کردن در سایه و همچنین خشک‌کردن در نور آفتاب + سایه، درصد منوترپن‌های اکسیژن‌دار که باعث عطر و طعم و خواص دارویی عرق نعنا می‌شوند، در مرحله قبل از گلدهی بین ۴ تا ۵ درصد از مرحله گلدهی کامل بیشتر است. در حالیکه در روش خشک‌کردن کامل در نور آفتاب، درصد آنها در مراحل قبل و بعد از گلدهی تقریبا مساویست. مقدار منوترپن‌های هیدروکربنی در روش خشک‌کردن در سایه از سایر روشهای خشک کردن بالاتر است. دلیل این موضوع نقطه جوش پایین‌تر و فراریت بیشتر این ترکیبات است که خشک‌کردن در آفتاب به دلیل بالاتر بودن دما، باعث تبخیر بخشی از آنها شده است.

ترکیب منتول در تمامی شرایط خشک‌کردن و برداشت گیاه بیشترین مقدار را در بین ترکیبات به خود اختصاص داد و سپس منتون و ایزومنتون در رتبه‌های بعدی بودند. منتول به صورت طبیعی به شکل یک کریستال یا پودر بی‌رنگ است (Loolaie *et al.*, 2017). ماهیت ضد گرفتگی عضلات به دنبال مصرف نعناع فلفلی به دلیل وجود همین ماده منتول است (Peat et al., 2016). منتول همچنین در تحریک جریان صفرا (Arab Ameri *et al.*, 2016)، کاهش تحرکات اسفنکتر مری (Öktemer *et al.*, 2015)، کاهش احساس عصبانیت (Babaeian *et al.*, 2017)، و القای خصوصیات ضد میکروبی (Choi *et al.*, 2016) نقش دارد. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می شود، بیشترین مقدار منتول، به عنوان مهترین ترکیب طعم دهنده و دارویی عرق نعنا در روش خشک کردن در سایه و سپس خشک کردن در آفتاب + سایه، در مرحله گلدهی کامل بدست آمد. ترکیب میرسن در روش‌های خشک کردن کامل در آفتاب یا سایه دیده نشد و گاما–ترپینن نیز در نمونه‌های خشک‌شده در سایه وجود نداشت. همچنین، مقادیر منتیل استات در نمونه‌های گلدهی کامل بیشتر از نمونه‌های قبل از گل‌دهی بود.

در مطالعه حاضر، مقادیر اسانس عرق نعناع فلفلی به دست آمده از روش تقطیر در تمامی نمونه‌های آزمایشی بیش از یک درصد بود (دامنه ۱/۳۲٪ تا ۱/۹۶٪) که با نتایج گزارش شده در برخی مطالعات گذشته از مناطق جغرافیایی دیگر همخوانی دارد؛ ایالات متحده ۱/۷۳٪ (Narasimhamoorthy *et al.*, 2015)، یونان ۱/۶٪ (Giatropoulos *et al.*, 2018)، برزیل ۱/۵۵٪ تا ۱/۹۴٪ (Marques *et al.*, 2023)، و ایران (۱/۸۹٪) (Gavahian *et al.*, 2015). از طرف دیگر، نتایج مقادیر اسانس کمتری در برخی مطالعات گذشته گزارش شده است که برای مثال می‌توان به نمونه‌هایی از هند ۰/۷٪ (Kedia *et al.*, 2014) و برزیل ۰/۱۷٪ (de Sousa Barros *et al.*, 2015) اشاره کرد. مشخص شده است که درصدهای اسانس بالاتر از ۱ را می‌توان برای تولیدات صنعتی پیشنهاد نمود (Marques *et al.*, 2023)، و بنابراین میزان اسانس تولید شده در مطالعه حاضر بسیار حائز اهمیت و امیدبخش هستند. همچنین، و علاوه بر مقدار کمی اسانس، هزینه‌های تولید اسانس نیز اهمیت دارند. کمترین هزینه‌های تولید زمانی حاصل می‌شود که مدت زمان فرآیند عرق‌گیری کاهش یافته و مقدار عرق برداشتی زیاد باشد (Marques *et al.*, 2023). بیشترین مقادیر اسانس در مطالعه حاضر در اندام‌های گل‌دار خشک شده در سایه و در حجم برداشتی ۶ به ۱ اندازه‌گیری شد که نشان می‌دهد شرایطی ایده‌آل برای فرآیند بوده است.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عوامل مختلف دخیل در تولید عرق و اسانس گیاه نعناع فلفلی بر کیفیت محصول نهایی تأثیرگذار هستند. نمونه‌های گیاهی در مرحله برداشت گلدهی کامل کامل منجر به حصول مقادیر بیشتری از اسانس شدند. همچنین، حجم‌های برداشت عرق نیز بر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مؤثر بوده و بهترین کیفیت عرق در ارتباط با مقدار اسانس و عدد استری و اکسایش در تیمارهای ۲ و ۴ نسبت به گیاه اولیه حاصل شد. نتایج این مطالعه همچنین حاکی از اثرات معنادار مرحله برداشت و شرایط مختلف خشک‌کردن نمونه‌ها بر مقدار و ترکیبات اسانس بود که نمونه‌های گلدهی کامل و خشک‌شده در آفتاب+سایه باکیفیت‌ترین و بیشترین اسانس را منجر شدند. در مطالعه حاضر از روش‌های سنتی خشک‌کردن و تقطیر با آب برای تولید عرق استفاده شد و بنابراین پیشنهاد می‌شود که اثرات دیگر روش‌های توسعه یافته برای تولید عرق نعناع فلفلی باکیفیت آزمایش گردد.

منابع

Akhoondi, R., Mirjalili, M. H., and Hadian, J. (2015). Quantitative and qualitative variations in the essential oil of *Rosa foetida* Herrm. (Rosaceae) flowers as affected by different drying methods. Journal of Essential Oil Research *27*, 421-427.

Arab Ameri ,S., Samadi, F., Dastar, B., and Zerehdaran, S. (2016). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) powder on immune response of broiler chickens in heat stress. Iranian Journal of Applied Animal Science *6*, 435-445.

Arakawa, T., and Osawa, K. (2000). Pharmacological study and application to food of mint flavour-antibacterial and antiallergic principles. Aroma Research *1*, 20-23.

Babaeian, M., Naseri, M., Kamalinejad, M., Ghaffari, F., Emadi, F., Feizi, A., Rafiei, R., Mazaheri, M., Hasheminejad, S. A., and Park, J. W. (2017). The efficacy of mentha longifolia in the treatment of patients with postprandial distress syndrome: A double-blind, randomized clinical trial.

Bartley, J. P., and Jacobs, A. L. (2000). Effects of drying on flavour compounds in Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). Journal of the Science of Food and Agriculture *80*, 209-215.

Berktas, S. and Cam, M., 2021. Peppermint leaves hydrodistillation by-products: bioactive properties and incorporation into ice cream formulations. Journal of Food Science and Technology. 2021 Nov; 58(11): 4282–4293.

Ćavar Zeljković, S., Šišková, J., Komzáková, K., De Diego, N., Kaffková, K., and Tarkowski, P. (2021). Phenolic compounds and biological activity of selected Mentha species. Plants *10*, 550.

Chen, J., and Wang, H. (2021). Density, viscosity, and saturated vapour pressure of 3-chloro-4-fluoronitrobenzene and 3-chloro-2-fluoronitrobenzene. The Journal of Chemical Thermodynamics *154*, 106337.

Choi, O., Cho, S. K., Kim, J., Park, C. G., and Kim, J. (2016). Antibacterial properties and major bioactive components of *Mentha piperita* essential oils against bacterial fruit blotch of watermelon. Archives of Phytopathology and Plant Protection *49*, 325-334.

de Sousa Barros ,A., de Morais, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., de Menezes, J. E. S. A., da Silva, F. W. F., and de Sousa, H. A. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from Mentha species. Industrial Crops and Products *76*, 557-564.

Dmytryshyn, S., Dalai, A., Chaudhari, S., Mishra, H., and Reaney, M. (2004). Synthesis and characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties. Bioresource Technology *92*, 55-64.

Gavahian, M., Farahnaky, A., Farhoosh, R., Javidnia, K., and Shahidi, F. (2015). Extraction of essential oils from Mentha piperita using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. Food and Bioproducts Processing *94*, 50-58.

Giatropoulos, A., Kimbaris, A., Michaelakis, A., Papachristos, D. P., Polissiou, M. G., and Emmanouel, N. (2018). Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against Aedes albopictus. Parasitology research *117*, 1953-1964.

Grigoleit, H.-G., and Grigoleit, P. (2005). Peppermint oil in irritable bowel syndrome. Phytomedicine *12*, 601-606.
Heravi, M. J., and Sereshti, H. (2007). Determination of essential oil components of *Artemisia haussknechtii* Boiss. using simultaneous hydrodistillation-static headspace liquid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry. Journal of Chromatography A *1160*, 81-89.
Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., and Lawrence, B. M. (2013 .(Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. Phytochemistry *96*, 15-25.
Kaya, C., Hamamci, C., Baysal, A., Akba, O., Erdogan, S., and Saydut, A. (2009). Methyl ester of peanut (Arachis hypogea L.) seed oil as a potential feedstock for biodiesel production. Renewable Energy *34*, 1257-1260.
Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C., and Dubey, N. K. (2014). Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. International Biodeterioration & Biodegradation *89*, 29-36.
Keifer, D., Ulbricht, C., Abrams, T. R., Basch, E., Giese, N., Giles, M., Kirkwood, C. D., Miranda, M., and Woods, J. (2008). Peppermint (*Mentha Xpiperita*) An evidence-based systematic review by the natural standard research collaboration. Journal of herbal pharmacotherapy *7*, 91-143.
Kumar, R., Sharma, S., Sharma, S., Sharma, M., and Kumar, N. (2018). Influence of flower to water ratio and distillation time of damask rose (*Rosa damascena* Mill.) flowers on essential oil content and composition in the western Himalayas. Journal of Essential Oil Research *30*, 353-359.
Liang, J., Zhang, Y., Chi, P., Liu, H., Jing, Z., Cao, H., Du, Y., Zhao, Y., Qin, X., and Zhang, W. (2023). Essential oils: Chemical constituents ,potential neuropharmacological effects and aromatherapy-A review. Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine *6*, 100210.
Loolaie, M., Moasefi, N., Rasouli, H., and Adibi, H. (2017). Peppermint and its functionality: A review. Arch Clin Microbiol *8*.٥٤ ,
Lucchesi, M. E., Chemat, F., and Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. Journal of Chromatography a *1043*, 323-327.
Marques, S. d. P. P. M., Pinheiro ,R. O., Nascimento, R. A. d., Andrade, E. H. d. A., and Faria, L. J. G. d. (2023). Effects of harvest time and hydrodistillation time on yield, composition, and antioxidant activity of Mint essential oil. Molecules *28*, 7583.
McKay, D. L., and Blumberg, J .B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives *20*, 519-530.
Mokhtarikhah, G., Ebadi, M.-T., and Ayyari, M. (2020). Qualitative changes of spearmint essential oil as affected by drying methods. Industrial crops and products *153*, 112492.
Narasimhamoorthy, B., Zhao, L., Liu, X., Yang, W., and Greaves, J. (2015). Differences in the chemotype of two native spearmint clonal lines selected for rosmarinic acid accumulation in comparison to commercially grown native spearmint. Industrial Crops and Products *63*, 87-91.
Öktemer, T., Kağan, İ., Muluk, N. B., and Cingi, C. (2015). A pastille combining myrrh tincture, peppermint oil and menthol to treat the upper airway. ENT Updates *5*, 128-131.
Park, K. J., Vohnikova, Z., and Brod, F. P. R. (2002). Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispa* L.). Journal of Food Engineering *51*, 193-199.
Peat, J., Frazee, C., Kearns, G., and Garg, U. (2016). Determination of Menthol in Plasma and Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis: Methods and Protocols, 205-211.
Rguez, S., Msaada, K., Daami-Remadi, M., Chayeb, I., Bettaieb Rebey, I., Hammami, M., Laarif, A., and Hamrouni-Sellami, I. (2019). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Salvia officinalis* aerial parts as affected by diurnal variations. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology *153*, 264-272.
Riachi, L. G., and De Maria, C. A. (2015). Peppermint antioxidants revisited. Food chemistry *17*.٨١-٧٢ ,٦

Rohloff, J., Dragland, S., Mordal, R., and Iversen, T.-H. (2005). Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield, and quality of peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal of agricultural and food chemistry *53*, 4148-4143.

Sefidkon, F., Abbasi, K., and Khaniki, G. B. (2006). Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. Food chemistry *99*, 19-23.

Sellami, I. H., Wannes, W. A., Bettaieb, I ,.Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B., and Limam, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. Food chemistry *126*, 691-697.

Szterk, A., Roszko, M., Sosińska, E ,.Derewiaka, D., and Lewicki, P. (2010). Chemical composition and oxidative stability of selected plant oils. Journal of the American Oil Chemists' Society *87*, 637-645.

Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., and Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules *23*, 762.

Zhang, L.-L., Chen, Y., Li, Z.-J., Li, X., and Fan, G. (2022). Bioactive properties of the aromatic molecules of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil: A review. Food & Function *13*, 3110-3132.

Zhao, Q., Li, M., Li, M., Jin, L., and Wei, J. (2023). Changes in growth characteristics and secondary metabolites in *Sinopodophyllum hexandrum* with increasing age. Industrial Crops and Products *196*, 116509.

Zheljazkov, v. and Astatkie, T., 2012. Distillation waste water can modify peppermint (*Mentha ×piperita* L.) oil composition. Industrial Crops and Products, 36(1): 420-426.

ویراستاری نشده

Extended abstract

Introduction

Standardization of the protocols for distillation process plays an important role to improve the quality of plant distilled water. Peppermint (*Mentha piperita* L.) is a hybrid between spearmint (*M. spicata*) and water mint (*M. aquatica*) belongs to the Lamiaceae family. It is a common herb with various domestic and industrial applications. In fact, peppermint is widely used in the food, pharmaceutical, perfumery and flavoring industries. The main constituent of the Peppermint essential oil is menthol which is the major factor of its taste and smell. As a result, peppermint oils have been dominantly applied in manufacture of toothpaste and flavored drinks. However, the distillate and essential oils of mint can be variable depend on the distillation process.

Materials and Methods

In the present study, two main experiments were carried out to standardize the physicochemical parameters of Mint distillate with proper amount of qualified oils. In the first experiments, peppermint were harvested at two different stages of growth (vegetative and full flowering), distillated with the water distillation method, and taken at 2, 4, 6, 8 distillate to the plant ration. On the second experiment, three drying methods consisted of drying in full shade, under sunlight+shade, and just under sunlight were applied to assess the distillate physicochemical indices and quantity and quality of the essential oils. The physicochemical parameters were acidity no., pH, relative density, ester no., oxidation no., and iodine no values. Also, Gas Chromatography (GC) and GC-Mass Spectrometry (GC/MS) analysis were used to identify and determination the essential oils composition. Two-way analyses of variance were applied to analyze the measured data obtained from the two experiments.

Results and Discussion

Significant effects of harvesting time, distillate to plant ratio, and their combination were observed for the ester no., oxidation no., iodine no., and essential oil content of the peppermint distillates. Vegetative samples at the 4:1 distillate to plant ratio showed higher ester (10.8 ± 0.02) and oxidation (165.33 ± 70.46) numbers than the flowering plants. However, Total amount of essential oils were higher in the flowering (37.83 ± 5.9) than the vegetative (28.25 ± 8.73) stages samples. Also, distillates of 2:1 (35.50 ± 3.56) and 4:1 (40.33 ± 5.53) had higher essential oils than the other resulted distillate treatments. The results also showed that in the both harvesting stages, drying in the shade is associated with a significant increase in essential oil and a decrease in ester and iodine number. Drying under sunlight led to higher pH, ester number and iodine number of the distillates. The highest values of oxidation no. and essential oil content were observed in distillates obtained from flowering and shade-dried samples. Also, drying the samples under the sun and then in the shade caused the amount of essential oils to be higher than drying under the sunlight alone. GC/MS analyses showed different constituents in the essential oils, major of them were menthol (33.9-40.6 %) and menthone (11.3-34.9 %).

Conclusion

The results of the present study indicated that during the water distillation, peppermint at the flowering stage can result in more essential oils content along with higher amounts of menthol and menthone. Also, physicochemical indices and oil content of the 2 and 4 distillates to plant ration were higher than those of other ratio treatments. We also found that flowering plants drying under sunlight+shade condition can lead to higher quality distillate. Additional research is needed to investigate the effects of distillation methods on the essential oils of peppermint.