The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

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 ratios

Reyhaneh Taebnia [1], Fatemeh Sefidkon [2]✉, Ali Mohammadi Torkashvand [3], Ali Ashraf Jafari [4], Sepideh Kalate Jari [5]

1. Department of Horticultural Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: r.taebnia@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Medicinal Plants, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Email: sefidkon@rifr-ac.ir
3. Department of Horticultural Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: m.torkashvand54@yahoo.com
4. Department of Rangelands, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Email: aajafari@rifr-ac.ir
5. Department of Horticultural Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: kalatehjari@srbiau.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 28 January 2024

Received in revised form: 25 March 2024

Accepted: 9 April 2024

Published online: Summer 2024

Keywords:

distillation,

plant distillate,

essential oils,

standard quality.

ABSTRACT

This study investigated the effects of harvesting time including vegetative and flowering stages and four different ratio of volumes of distillate to 1 kg of fresh plant (2, 4, 6, and 8 L per 1 kg fresh plant) on physiochemical characters and essential oils of the peppermint (*Mentha piperita* L.) distillate. In addition, comparisons were made between distillate resulted from dried (drying in shade, sunlight+shade, and sunlight) and fresh peppermint samples. Distillation was performed using the water distillation method. Standard protocols were used to investigate the physiochemical properties of distillate. Analyses 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 volume on ester number, oxidation number, iodine number, and essential oils quantity of the distillate. The highest amount of ester no. (10.8 ± 0.02) and oxidation no. (165.33 ± 70.46) was quantified in the vegetative stage and 1:4 L of distillate. Total amount of essential oils in the flowering (37.83% ± 5.9) were higher than the vegetative (28.25 ± 8.73) stages. In addition, distillates volumes of 2:1 (35.50 ± 3.56%) and 4:1 (40.33 ± 5.53%) had higher essential oils than the other distillate volumes. 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 that the peppermint distillate may have higher quality when the plants harvested at flowering stage, dried at sunlight+shade, and distillate taken at 2 and/or 4 L to 1 kg plant.

Cite this article: Taebnia, R., Sefidkon, F., Mohammadi Torkashvand, A., Afshraf Fafari, A., Kalate Jari, S. (2024). 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 ratios. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (2), 331-347. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.371551.2151

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.371551.2151

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.), which 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. Peppermint oils have been dominantly applied in manufacture of toothpaste and flavored drinks. However, the quality and quantity of 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 was harvested at two different stages of growth (vegetative and full flowering), and subjected to water distillation, mint distillate were obtained in four volumes (2, 4, 6 and 8, which were the ratio of the distillate volume to a certain amount of fresh plant, 1000 g) and examined for their physicochemical properties. On the second experiment, plants were harvested at two harvesting time (vegetative and flowering stage) and three drying methods, consisting of drying in shade sunlight+shade, and sunlight were applied to assess the distillate physicochemical indices and quantity and quality of the essential oils. The studied l parameters were acidity no., pH, relative density, ester no., oxidation no., and iodine no values. Also in the second experiment, Gas Chromatography (GC) and GC-Mass Spectrometry (GC/MS) analysis were used to identify and quantify the essential oils compositions. Two-way analyses of variance were applied to evaluate quality of peppermint distillate and Duncan's multiple range tests were used to compare the characters means.

Results and Discussion

The results showed that harvesting time, distillate volume, and their interaction effect significantly affected the ester no., oxidation no., iodine no., and essential oil content of the peppermint distillates. Distillate derived from plants harvested at vegetative stage in a volume of 4 showed higher ester (10.8 ± 0.02) and oxidation (165.33 ± 70.46) numbers than the plants derived at flowering stage. However, total amount of essential oils was greater in the plants of flowering (37.83 ± 5.9 mg/100 ml) than the vegetative (28.25 ± 8.73 mg/100 ml) stages. Also, distillates in volumes 2:1 (35.50 ± 3.56 mg/100 ml) and 4:1 (40.33 ± 5.53 mg/100 ml) had higher essential oils than the other distillate volumes. 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 plants were harvested at flowering stage and shade-dried. Also, drying the samples under the sun and then in the shade caused an increase in the amount of essential oils compared to drying under the sunlight alone. GC/MS analyses showed different constituents in the essential oils of plants under treatments, major components were menthol (33.9-40.6 %) and menthone (11.3-34.9 %).

Conclusion

According to the present study harvesting peppermint at the flowering stage can result in greater essential oils content and higher amounts of menthol and menthone compared to the vegetative stage. Furthermore, the physicochemical indices and oil content of the two and four volumes of distillates were higher than those of the other examined volumes. We also found that harvesting at flowering stage and drying under sunlight+shade condition can lead to higher quality of distillate. Additional research is needed to investigate the effects of other distillation methods on the essential oils characteristics of peppermint.

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۵، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

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 حجم عرق به وزن گیاه

ریحانه طائب نیا[۱] | فاطمه سفیدکن[۲]✉ | علی محمدی ترکاشوند [۳] | علی اشرف جعفری[۴] | سپیده کلاته جاری[۵]

۱. گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: r.taebnia@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه:sefidkon@rifr-ac.ir

۳. گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: m.torkashvand54@yahoo.com

۴. بخش تحقیقات مرتع، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: aajafari@rifr-ac.ir

۵. گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: kalatehjari@srbiau.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۱

تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:

عرق‌گیری، عرقیات گیاهی، اسانس، کیفیت استاندارد.

چکیده

در این مطالعه، تأثیر مرحله برداشت (رویشی و زایشی) و نسبت های مختلف حجم عرق به یک کیلوگرم گیاه تازه (۱:۲، ۱:۴، ۱:۶ و ۱:۸ لیتر) 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 خصوصیات فیزیکوشیمیایی گیاه تازه مقایسه شد. از روش‌های استاندارد برای تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرقیات و استخراج و اندازه‌گیری اسانس موجود در عرق استفاده شد 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 چهار به یک (به‌ترتیب نسبت حجمی 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 دو به یک (۳/۵۶ ± ۳۵/۵۰) و چهار به یک (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 دو و چهار لیتر به یک کیلو گیاه، و خشک کردن در شرایط آفتاب+سایه از کیفیت بالاتری برخوردار است.

استناد: طائب نیا، ریحانه؛ سفیدکن، فاطمه؛ محمدی ترکاشوند، علی؛ اشرف جعفری، علی و کلاته جاری، سپیده (۱۴۰۳). 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 حجم عرق به وزن گیاه. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۵ (۲)، ۳۴۷-۳۳۱. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.371551.2151

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.371551.2151

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 درصد 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). نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) گیاهی علفی و دائمی متعلق به تیره نعنائیان بوده که در واقع یک هیبرید طبیعی بین نعناع دشتی (*M. spicata* L.) و نعناع آبی (*M. aquatic* L.) می‌باشد (McKay & 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 و 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 & 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 از 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 و 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 تازه، چین، 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 مدت 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 دو به یک (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. بنابراین، 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، همچنین 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 a*l., 2013). گزارش شده است که اسانس نعناع خواص آنتی‌اکسیدانی (Keifer *et al*., 2008) و فعالیت‌های ضد میکروبی (Arakawa & Osawa, 2000) داشته و از مهمترین ترکیبات موجود در داروهای مقابله با سندرم روده تحریک‌پذیر است (Grigoleit & 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 درجه سانتی‌گراد 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 دو ساعت تقطیر با آب است. تمدید تقطیر با آب از یک تا دو ساعت تأثیر ناچیزی بر محتوای فنلی داشت. فنول غالب نعناع (اریوسیترین) ۹۱۷/۵ میلی‌گرم در لیتر در عرق پس از یک ساعت تقطیر بود. تقطیر چهار ساعته نعناع فلفلی منجر به کاهش مقدار اریوسیترین شد، اما عرق نعناع فلفلی حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات فنولی (۸۴۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بود (Berktas & Cam, 2021).

مطالعه دیگری نشان داده است که عرق نعناع فلفلی 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. نتایج این تحقیق نشان داد که محصول جانبی عرق گیاهی نعناع فلفلی 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 & Astatkie, 2012).

با توجه به سابقه استفاده گسترده از عرق نعناع فلفلی در ایران و تأثیر فاکتورهای مختلف بر کیفیت آن، در مطالعه حاضر اثر مرحله برداشت و مقدار عرق برداشتی نسبت به وزن گیاه بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این عرق سنجیده شد. همچنین تاثیر مرحله برداشت و روش خشک کردن (و مقایسه با گیاه تازه) بر ویژگی‌های کمی و کیفی عرق نعناع فلفلی و اسانس آن بررسی شد.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی

کشت گیاه نعناع فلفلی در مزرعه تحقیقاتی زیبادشت کرج سازمان فنی و حرفه ای کشور انجام شد. قبل از عملیات کشت، از خاک محل اجرای آزمایش در آزمایشگاه خاک شناسی موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور نمونه‌برداری شد و سپس کلیه عملیات زراعی بر حسب نتایج خصوصیات خاک انجام گردید (جدول ۱). استولن‌های گیاه نعناع فلفلی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و در پنج کرت به ابعاد ۵ در ۱۰ متر مربع با در نظر گرفتن فاصله ۳۰ سانتی‌متری بین بوته‌ها کشت شدند. آبیاری بوته‌ها بلافاصله بعد از کشت انجام شد و 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

پی‌اچ	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	شن	سیلت	رس	مواد آلی	نیتروژن	P	K	Fe	Zn	Mn
		(درصد)					(میلی‌گرم بر کیلوگرم)				
۷/۸	۱/۶	۶۶/۷	۱۴/۵	۱۸/۸	۰/۹	۰/۵	۴۴	۱۲۰	۶/۷	۰/۸	۲/۶

به منظور بررسی تأثیر مرحله برداشت و نسبت حجم عرق حاصل به مقدار گیاه اولیه بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی عرق نعناع، مجموعا هشت تیمار در نظر گرفته شد. ابتدا گیاهان در دو مرحله رشدی قبل از گل‌دهی (رویشی) و مرحله گل‌دهی کامل (زایشی) برداشت شدند و عملیات عرق گیری روی آنها انجام شد. نمونه های عرق در چهار نسبت ۲:۱، ۴:۱، ۶:۱ و ۸:۱ (مقدار حجم عرق برداشت شده نسبت به مقدار گیاه مورد استفاده برای عرق‌گیری) در چهار تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند.

سرشاخه سبز گیاهان در ابتدای صبح روز 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 درجه سلسیوس حفظ نمود (Marques *et al*., 2023). در هر نمونه‌گیری، مقدار یک 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 شده و پس از سرد شدن در قسمت جمع‌آوری خروجی عرق و اسانس جمع‌آوری شدند. برای آزمایشات مختلف به محض رسیدن به حجم مورد نظر از عرق، دستگاه خاموش شد. ابتدا اسانس جمع‌آوری شده از روی عرق نعناع برداشته شد و سایر آزمون‌ها بر روی آن انجام شدند.

همچنین، گیاهان در دو مرحله قبل از گلدهی (رویشی) و گلدهی کامل (زایشی؛ باز شدن سنبله در بیش از ۵۰ درصد گیاهان) نمونه‌برداری شده، و عرق آنها در حجم‌های برداشتی ۱:۲، ۱:۴، ۱:۶، و ۱:۸ (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 شش به یک (حجم عرق به وزن گیاه اولیه) در رابطه با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی با این مقادیر در گیاهان تازه سنجش شدند. انتظار می‌رود که با تغییر این عامل‌ها، کیفیت ترکیبات شیمیایی اسانس و خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی متفاوت باشد.

تعیین کیفیت عرق

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

چگالی عرق نعناع با استفاده از پیکنومتر شیشه‌ای (دقت $\pm 5 \times 10^{-4}$ گرم بر سانتی‌متر مکعب) در دمای ۲۰ درجه سلسیوس 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 دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بر حجم مشابه آب در دمای مشابه و بر طبق رابطه ۱ اندازه‌گیری شد (Chen and Wang, 2021).

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

در این رابطه، M1: وزن (گرم) پیکنومتر خالی در دمای ۲۰ درجه سلسیوس؛ M2: وزن (گرم) پیکنومتر حاوی آب در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد؛ M3: وزن (گرم) پیکنومتر حاوی عرق نعناع دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

مقدار پی‌اچ عرق نعناع با استفاده از یک دستگاه سنجش پی‌اچ اندازه‌گیری شد.

به منظور تعیین عدد اسیدی نمونه‌های عرق، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه 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.

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

در این رابطه A: عدد اسیدی بر مبنای اسید استیک (میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر) بوده، و V: حجم هیدروکسید سدیم مصرف شده (میلی‌لیتر) می‌باشد.

برای تعیین عدد استری، ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه عرق با استفاده از محلول ۰/۰۱ نرمال هیدروکسید سدیم در حضور فنول‌فتالئین برای رسیدن به رنگ صورتی مات تیتر گردید. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم دیگر به محلول اضافه شد، و در یک ارلن دربسته در بن‌ماری با دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت حرارت داده شد تا تمامی استرها صابونی شوند. در انتهای واکنش، محلول تا رسیدن به دمای اتاق سرد شد و با کمک محلول اسید هیدروکلریک ۰/۰۲ نرمال تا رسیدن به رنگ صورتی مات تیتر شد. این فرایند در شرایط کاملاً مشابه با استفاده از آب مقطر نیز به عنوان تست کنترل صورت گرفت. عدد استری با استفاده از رابطه ۳ محاسبه گردید.

$$S = 2 \times (B - A)$$ رابطه ۳)

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

برای تعیین عدد اکسایش نمونه‌های عرق، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک محلول و ۱۵ میلی‌لیتر پرمنگنات پتاسیم ۰/۱ نرمال مخلوط شد و در یک ارلن دربسته به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک نگهداری شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد پتاسیم یدید و چند قطره محلول نشاسته به آن اضافه گردید و با استفاده از محلول ۰/۱ 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 اکسایش در نهایت با کمک رابطه ۴ محاسبه گردید.

$$X = 20 \times (B - A)$$ رابطه ۴)

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

برای تعیین عدد یدی، به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر نمونه عرق، تا خنثی شدن پی‌اچ نمونه، محلول ۰/۰۱ نرمال هیدروکسید سدیم اضافه گردید. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم و ۱۰ میلی‌لیتر محلول ید نیز به آن اضافه شدند و در یک ارلن دربسته به مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریک نگهداری شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر 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 (میلی‌لیتر) تیوسولفات سدیم استفاده شده در تست نمونه عرق؛ و B: حجم (میلی‌لیتر) تیوسولفات سدیم مصرف شده در تست کنترل است.

مقادیر اسانس در نمونه‌های عرق با روش پنتان تعیین شد (Heravi & Sereshti, 2007). برای این منظور، ۲۵۰ میلی‌لیتر از نمونه به یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتر انتقال یافته و سپس ۳۳ میلی‌لیتر ان–پنتان و ۵۰ گرم 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 شد 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 (میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر)؛ A: وزن (گرم) ارلن حاوی اسانس؛ و B: وزن (گرم) 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 متر، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی‌متر، و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) مجهز بوده و دارای آشکارساز یونش شعله (FID) بود. برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه نیز از ۴۰ تا ۲۴۰ درجه سلسیوس با سرعت افزایش ۳ درجه سلسیوس در دقیقه بود. دمای آون دستگاه در ابتدا و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و سپس با نرخ ثابت ۳ درجه در دقیقه به ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. درجه حرارت آشکارساز در ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و دمای ناحیه تزریق نیز ۲۵۰ درجه سلسیوس 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 دالتون بود. درصد حجمی هر ترکیب با استفاده از داده‌های FID با تکنیک نرمال‌سازی ناحیه بدست آمد و شناسایی ترکیبات با مقایسه طیف جرمی آن با داده‌های استاندارد دستگاه (Adams & Wiley 7.0) و محاسبه شاخص‌های بازداری تعیین گردید (Akhoondi *et al.*, 2015).

طرح آزمایشی و آنالیز داده‌ها

در این تحقیق آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل و در طرح بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. همگن بودن داده‌ها با استفاده از آزمون لیون 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 احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج

اثر مرحله برداشت گیاه و حجم برداشت عرق بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی

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 پی‌اچ، عدد اسیدی، و تراکم نسبی دیگر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های عرق نعناع فلفلی از مرحله برداشت گیاه و حجم عرق تأثیر معنادار گرفتند. به دنبال فرآیند تقطیر، آنالیز داده‌ها نشان دادند که حجم برداشت عرق تاثیر معنادری بر ۲ لیتر (نسبت ۱:۲)، ۴ لیتر (نسبت ۱:۴)، ۶ لیتر (نسبت ۱:۶)، و ۸ لیتر (نسبت ۱:۸) 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 عدد اسیدی، پی‌اچ و تراکم نسبی عرق داشتند (جدول ۲).

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		عدد اسیدی	پی‌اچ	عدد استری	تراکم نسبی	عدد اکسایش	عدد یدی	مقدار اسانس
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 (درصد)		۸/۲۸	۳/۲۱	۱۹/۱۲	۰/۱۳	۱۴/۱۸	۱۱/۴۸	۲/۴۹

* و **: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

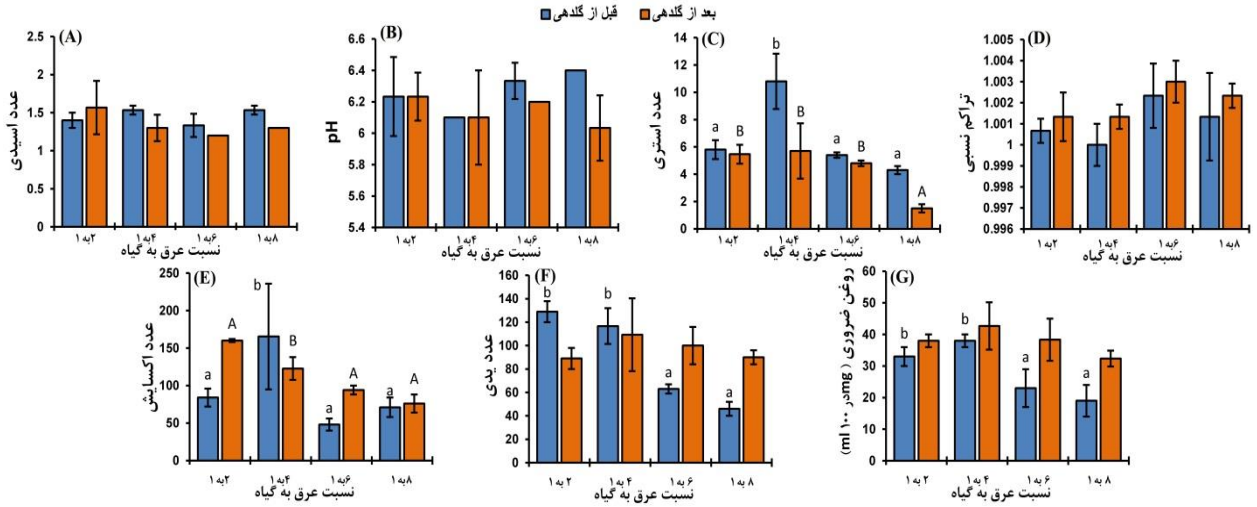
مقایسه میانگین اثر مرحله برداشت بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که عدد اکسایش و عدد یدی عرق حاصل از نمونه‌های رویشی (قبل از گل‌دهی) کمتر از این مقادیر در نمونه‌های مرحله گل‌دهی بود. به طور برعکس، عدد استری و مقدار اسانس نمونه‌های برداشت شده قبل از گل‌دهی بیش از نمونه‌های گل‌دار بود (جدول ۳).

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

مرحله برداشت	عدد اسیدی (میلی‌گرم CH3COOH بر ۱۰۰ میلی‌لیتر)	پی‌اچ	عدد استری	تراکم نسبی	عدد اکسایش	عدد یدی	مقدار اسانس (میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی-لیتر)
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 مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، می باشد.

عدد اسیدی نمونه‌های عرق حاصل از مرحله قبل از گل‌دهی و گل‌دهی کامل تفاوت معناداری در بین حجم‌های برداشتی عرق نداشتند (شکل A.۱). همچنین، پی‌اچ نمونه‌ها در قبل از گل‌دهی و گل‌دهی کامل بین حجم‌های برداشتی عرق تفاوتی نداشتند (شکل B.۱). با این حال، تفاوت معنادار آماری بین حجم‌های برداشتی عرق در عدد استری نمونه‌ها در هر دو مرحله قبل از گل‌دهی و گل‌دهی کامل مشاهده شد. بیشترین مقادیر عدد استری در مراحل قبل از گل‌دهی و گل‌دهی کامل در تیمار چهار لیتر اندازه‌گیری شد (شکل C.۱). با وجود کمتر بودن تراکم نسبی عرق نعناع فلفلی در حجم‌های برداشت ۱:۲ و ۱:۴ لیتر، تفاوت معناداری بین تیمارها در مرحله رویشی و زایشی مشاهده نشد (شکل D.۱). اثر مرحله برداشت و حجم برداشت و همجنین اثر متقابل آنها بر عدد اکسایشی در سطح یک درصد معنا دار بود. نمونه‌های گیاه نعناع فلفلی برداشت شده قبل از گل‌دهی تفاوت معناداری در در عدد اکسایش عرق در بین حجم‌های برداشتی شد. همچنین، تفاوت معنادار بسیار واضح در نمونه‌های گل‌دهی کامل مشاهده شد (شکل E.۱). در رابطه با مقدار عدد یدی، تفاوتی در بین حجم‌های برداشتی عرق گلدهی کامل نمونه‌ها مشخص نشد ؛ اگرچه، عدد یدی تیمارهای حجمی عرق در نمونه‌های قبل از گل‌دهی تفاوت معناداری بروز دادند به صورتی که با افزایش نسبت عرق برداشتی عدد یدی کاهش پیدا کرد (شکل F.۱). همچنین، مقدار اسانس موجود در حجم‌های مختلف برداشت عرق در نمونه‌های حاصل از قبل از گل‌دهی تفاوت معنادار داشتند؛ اما در مرحله گل‌دهی کامل تفاوتی بروز ندادند. به طور کلی، مقادیر اسانس در حجم‌های برداشتی کمتر عرق، بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل G.۱).



شکل 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 کوچک برای مرحله قبل از گل‌دهی، و حروف بزرگ برای گل‌دهی کامل)

اثر مرحله برداشت گیاه و روش خشک کردن بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی

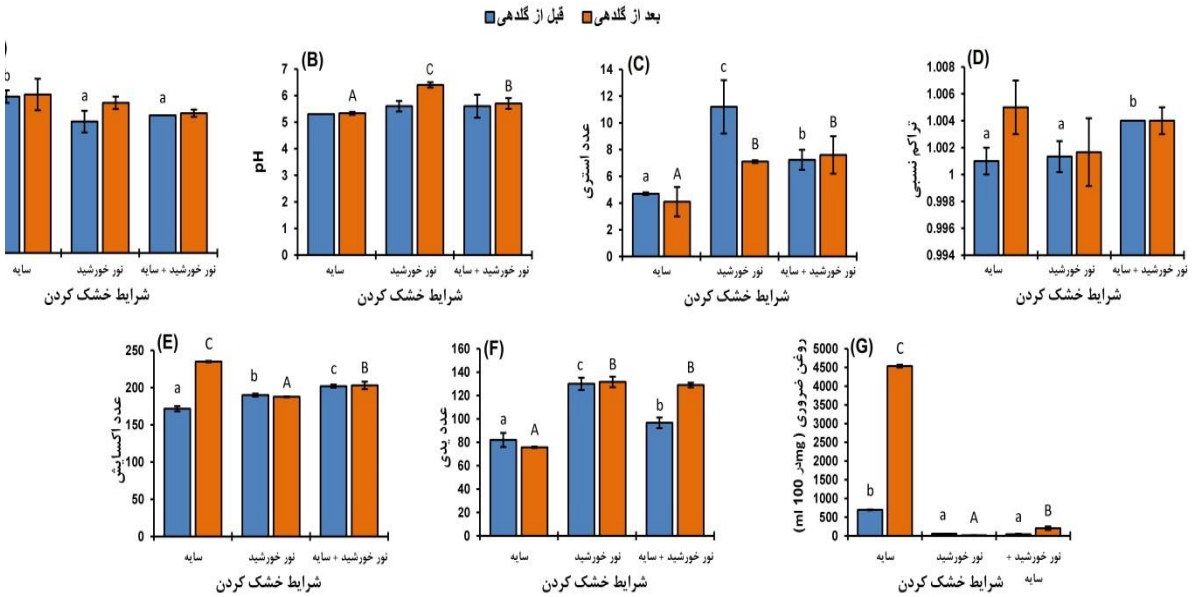
نمونه‌های دیگری از گیاه نعناع فلفلی در دو مرحله رویشی و زایشی برداشت شده و در شرایط مختلف خشک شدند. خصوصیات عرق حاصل از این آزمایش در نسبت ۱:۶ بررسی شد. نتایج آزمون واریانس چند متغیره حاکی از تأثیرات معنادار مراحل برداشت گیاه ($p < ۰/۰۰۱$)، روش‌های خشک‌کردن ($p < ۰/۰۰۱$) و اثر متقابل این دو عامل ($p < ۰/۰۰۱$) بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق بود (جدول ۴).

جدول ۴. جدول تجزیه واریانس دو–طرفه بین مراحل برداشت و نحوه خشک کردن بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		عدد اسیدی	پی‌اچ	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 **

* و **: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

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 (شکل ۲). از طرف دیگر، خشک کردن کامل زیر نور خورشید منجر به بیشتر بودن پی‌اچ، 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 شدن مقدار اسانس نسبت به خشک کردن کامل زیر نور خورشید گردید (شکل ۲).



نمودار ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل مرحله برداشت و روش خشک کردن بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی عرق نعناع فلفلی
(حروف کوچک روی ستون‌ها برای مرحله قبل از گل‌دهی، و حروف بزرگ برای گل‌دهی کامل درنظر گرفته شده است)

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. درصد اسانس در هر دو مرحله برداشت با هر سه روش خشک کردن بیش از یک درصد بود. نتایج حاکی از آن بودند که مقادیر اسانس برای نمونه‌های گل‌دار به طور معناداری بیشتر از نمونه‌های قبل از گل‌دهی بوده است. همچنین، نتایج نشان دادند که خشک کردن اندام‌های گیاهی در سایه می‌تواند با افزایش میزان اسانس همراه باشد (جدول ۶).

جدول ۵. اثر مراحل برداشت و نحوه خشک کردن بر میزان ترکیبات شیمیایی (درصد) اسانس عرق نعناع فلفلی براساس

ترکیبات	شاخص بازداری (IR)	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 ۶. میانگین درصد 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 تحت تأثیر مرحله برداشت گیاه (قبل از گل‌دهی و گلدهی کامل کامل) و نسبت برداشت عرق بعد از تقطیر به ماده اولیه (۱:۲، ۱:۴، ۱:۶، ۱:۸) گرفتند. همچنین، مقدار و کیفیت اسانس عرق نیز متناسب با مرحله برداشت و روش‌های مختلف خشک کردن، تغییر کرد.

اسیدیته نمونه‌های عرق نعناع فلفلی در دو شکل پی‌اچ 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 پی‌اچ 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 درصد 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 ۱:۸ (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 اثرمتقابل این دو عامل تأثیر معنادار گرفته بود. مقادیر مقاومت اکسایشی در حجم‌های برداشتی ۱:۲ و ۱:۴ 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 اثر متقابل این دو عامل تأثیر معناداری بر عدد یدی داشتند. میانگین عدد یدی تنها در نمونه‌های قبل از گل‌دهی و حجم برداشتی ۱:۸ 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 خشک کردن کامل در آفتاب یکسان بوده و تعداد بیشتری در تیمار آفتاب + سایه تأیید 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، از گیاه خشک شده مقادیر بیشتر و ترکیبات متنوع‌تر اسانس نسبت به گیاه تازه به‌دست می‌آید (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 منجر به مقدار قابل ملاحظه اسانس (۱/۹۰ درصد در نمونه‌های گل‌دار) و بیشترین تعداد ترکیبات (۲۱ عدد) اسانس گردد.

ترکیبات به دست آمده حاصل از آزمایش‌های کروماتوگرافی شامل مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و بدون اکسیژن، و سس-کوئی‌ترپن‌های 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 چهار تا پنج 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 مساوی است. 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 ۱/۹۶درصد) که با نتایج گزارش شده در برخی مطالعات گذشته از مناطق جغرافیایی دیگر همخوانی دارد: ایالات متحده ۱/۷۳درصد (Narasimhamoorthy *et al*., 2015)، یونان ۱/۶درصد (Giatropoulos *et al*., 2018)، برزیل ۱/۵۵ تا ۱/۹۴درصد (Marques *et al*., 2023)، و ایران (۱/۸۹درصد) (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 درصد (Kedia *et al*., 2014) و برزیل ۰/۱۷ درصد (de Sousa Barros et al., 2015) اشاره کرد. مشخص شده است که درصدهای اسانس بالاتر از یک 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 شش به یک 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 تاثیرگذار 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 حجم ۱:۲ و ۱:۴ 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 برداشت شده در مرحله گلدهی کامل و خشک‌شده در آفتاب+سایه باکیفیت‌ترین و بیشترین اسانس را تولید نمودند. 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.

REFERENCES

Akhoondi, R., Mirjalili, M. H., & 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., & Zerehdaran, S. (2016). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) powder on immune response of broiler chickens in heat stress. I*ranian Journal of Applied Animal Science*, 6, 435-445.

Arakawa, T., & 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., & Park, J. W. (2017). The efficacy of mentha longifolia in the treatment of patients with postprandial distress syndrome: A double-blind, randomized clinical trial. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 19(2), e34538.

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

Bartley, J. P., & 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. & Cam, M., 2021. Peppermint leaves hydrodistillation by-products: bioactive properties and incorporation into ice cream formulations. *Journal of Food Science and Technology*,. 58(11), 4282–4293.

Ćavar Zeljković, S., Šišková, J., Komzáková, K., De Diego, N., Kaffková, K., & Tarkowski, P. (2021). Phenolic compounds and biological activity of selected Mentha species. *Plants*, 10(3), 550.

Chen, J., & 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., & 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.

Dmytryshyn, S., Dalai, A., Chaudhari, S., Mishra, H., & 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., & 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., & 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., & Grigoleit, P. (2005). Peppermint oil in irritable bowel syndrome. *Phytomedicine*, 12(8), 601-606.

Heravi, M. J., & 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., & 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., & Saydut, A. (2009). Methyl ester of peanut (*Arachis hypogea* L.) seed oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Renewable Energy*, 34(5), 1257-1260.

Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C., & 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., & 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., & 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., & Zhang, W. (2023). Essential oils: Chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy-A review. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 6(2), 100210.

Loolaie, M., Moasefi, N., Rasouli, H., & Adibi, H. (2017). Peppermint and its functionality: A review. Archives of Clinical Microbiology, 8(4), 54.

Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323-327.

Marques, S. P. P. M., Pinheiro ,R. O., Nascimento, R. A., Andrade, E. H. A., & Faria, L. J. G. (2023). Effects of harvest time and hydrodistillation time on yield, composition, and antioxidant activity of mint essential oil. *Molecules* 28(22), 7583.

McKay, D. L., & Blumberg, J .B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(7), 519-530.

Mokhtarikhah, G., Ebadi, M. T., & Ayyari, M. (2020). Qualitative changes of spearmint essential oil as affected by drying methods. *Industrial crops and products*, 153, 112492.

Narasimhamoorthy, B., Zhao, L. Q., Liu, X., Yang, W., & Greaves, J. A. (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., Ipçi, K., Muluk, N. B., & 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., & 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., & Garg, U. (2016). Determination of menthol in plasma and urine by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). In U. Garg (Ed.), *Clinical applications of mass spectrometry in drug analysis: methods and protocols* (pp. 205-211). Springer.

Rguez, S., Msaada, K., Daami-Remadi, M., Chayeb, I., Bettaieb Rebey, I., Hammami, M., Laarif, A., & Hamrouni-Sellami, I. (2019). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Salvia officinalis* aerial parts as affected by diurnal variations. *Plant Biosystems*, 153(2), 264-272.

Riachi, L. G., & De Maria, C. A. B. (2015). Peppermint antioxidants revisited. *Food chemistry*, 176, 7281.

Rohloff, J., Dragland, S., Mordal, R., & 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., & 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(1), 19-23.

Sellami, I. H., Wannes, W. A., Bettaieb, I ,.Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B., & 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., & 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., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.

Zhang, L. L., Chen, Y., Li, Z. J., Li, X., & 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., & Wei, J. (2023). Changes in growth characteristics and secondary metabolites in *Sinopodophyllum hexandrum* with increasing age. *Industrial Crops and Products*, 196, 116509.

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