

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

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

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

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

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

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

### چکیده

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

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

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

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

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

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

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

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

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

طریق مقایسه آن با داده‌های مشخص قبلی (طیف‌های استاندارد) و در نظر گرفتن شاخص‌هایی چون اندیس بازداری آن را تفسیر کرده و پی به مواد تشکیل دهنده نمونه می‌برند (McMaster, 2007). شایان ذکر است که امروزه در دستگاه‌های GC-MS به ندرت از ستون‌های پر شده استفاده می‌شود چرا که سرعت‌های بالای گاز حامل با بخش خلاء طیف سنج جرمی سازگار نیست و هم اکنون ستون‌های موئین از نوع سیلیکای مذاب و انعطاف پذیر برای این دستگاه‌ها ترجیح داده می‌شوند زیرا به طور مستقیم می‌توان آن‌ها را از دمای کروماتوگرافی گازی به منبع تولید یون در طیف سنج جرمی متصل نمود. طیف سنج جرمی در واقع وسیله‌ای برای شناسایی پیک‌های ارسالی کروماتوگرافی گازی در هنگام خروج آن‌ها از ستون خواهد بود (Bekhradi and Khayat kashani, 2006). روش کروماتوگرافی گازی در کنار مزایای زیادی که دارد، مساله هزینه و زمان بر بودن، از اشکالات مهم آن بشمار می‌آید. محققان همواره به دنبال روش‌های برای تجزیه و تحلیل اسانس‌ها هستند که بتواند جایگزین روش GC-MS شود.

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

(Stashenko and Martinez, 2014). امروزه برای جداسازی و تشخیص اجزای موجود در اسانس از ادغام دو دستگاه کروماتوگرافی و طیف‌سنج جرمی استفاده می‌گردد. در این روش، گاز حامل با ترکیب‌ها به‌طور جداگانه و در زمان‌های مختلف از ستون خارج شده و پس از وارد شدن در آشکارساز ثبت می‌شوند. پس قبل از یونیزه شدن اجزاء مخلوط در طیف سنج جرمی، ابتدا اجزای اسانس توسط کروماتوگرافی گازی از یکدیگر جدا می‌شوند. در سیستم GC-MS دستگاه کروماتوگرافی گازی به طور مستقیم به یک طیف‌سنج جرمی متصل می‌شود. در GC-MS مولکول‌های سازنده نمونه که به صورت خالص از انتهای ستون کروماتوگرافی گازی خارج می‌شوند، تحت تأثیر بمباران الکترونی قرار گرفته و به‌صورت یون‌های مثبت ( $M^+$  یون مولکول) در می‌آیند و یون مولکول نیز به یون‌های کوچکتر شکسته می‌شود. سری یون‌های تولید شده به صورتی تجزیه می‌گردند که برای هر مقدار  $m/z$  علامتی به دست می‌آید. شدت هر علامت فراوانی نسبی را منعکس می‌کند. شدت بزرگترین علامت که پیک پایه<sup>۱</sup> نامیده می‌شود، معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شده و شدت سایر علامت‌ها نسبت به آن سنجیده می‌شود. یک نمودار که نشان دهنده شدت‌های نسبی علامت‌ها در مقادیر مختلف جرم اتمی / عدد اتمی ( $m/z$ ) باشد، طیف جرمی را تشکیل می‌دهد که یک شاخص بسیار مهم از یک ماده خاص است. امروزه برای کنترل دستگاه GC-MS داده‌های کمی آن، سیستم را به یک رایانه مجهز می‌کنند. این سیستم کامپیوتری می‌تواند برای کنترل GC-MS و ذخیره‌سازی و به کارگیری و بازخوانی داده‌ها به کار می‌رود. به این ترتیب برای هر جزئی (حتی در حد نانوگرم) که توسط کروماتوگرافی گازی جدا شده باشد، طیف جرمی به دست می‌آید که از

2. Raman spectroscopy

3. Refractometry

1. Base peak

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

#### مواد و روش‌ها

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

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

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

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

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

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

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

شرکت طیف سنج تجهیز پیشرفته، با محدوده طول موجی ۱۵۰-۴۵۰۰ بر سانتی متر، زمان اندازه گیری نمونه ها ۰/۱ ثانیه و توان لیزر ۳۰۰ میلی وات می باشد. طیف سنج سوم طیف سنج رامان شرکت تکسان بود که بازه شیف رامان آن از ۱۰۰ تا ۴۶۰۰ می باشد، همه این طیف سنج ها مجهز به یک لیزر ۵۳۲ نانومتر هستند.

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

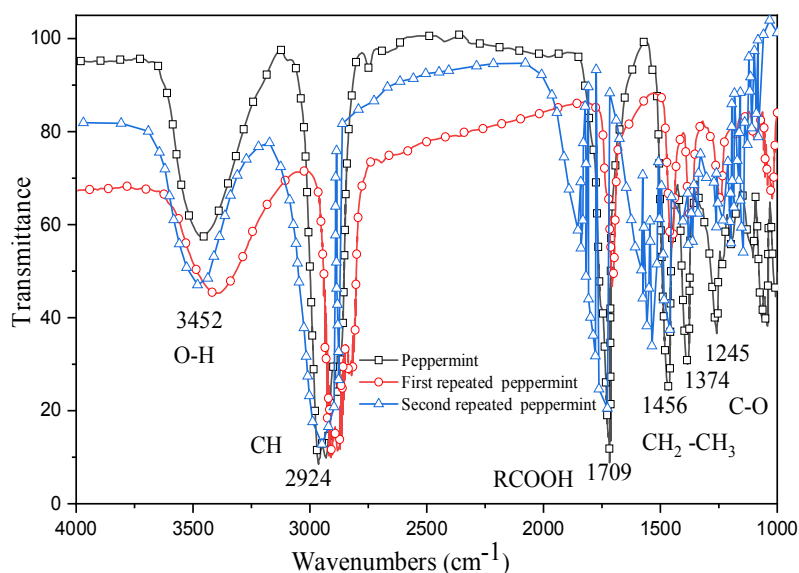
1. RI: InfraRed spectroscopy  
2. FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy

نعناع فلفلی در محدوده  $3600 - 3400$  مربوط به گروه‌های عاملی O-H و قوی‌ترین پیک‌ها در محدوده  $2850 - 3000$ ، مربوط به پیوند CH است. پیک  $1709$  مربوط به کربوکسیلیک اسیدها است و پیک‌های  $1456$  و  $1374$  مربوط به گروه‌های عاملی  $CH_2$  و  $CH_3$  می‌باشد. پیک‌های در محدوده  $1000 - 1320$  مربوط به پیوند C-O که تقریباً پیک‌های ضعیفی هستند و بیانگر پیوند‌های یک مولفه اصلی نیستند. طیف‌های نعناع فلفلی از نظر کیفی و تعیین گروه‌های عاملی برابر هستند ولی از نظر کمی دارای مقدارهای متفاوت یا به اصطلاح طول هر پیک متفاوت است.

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

## نتایج

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



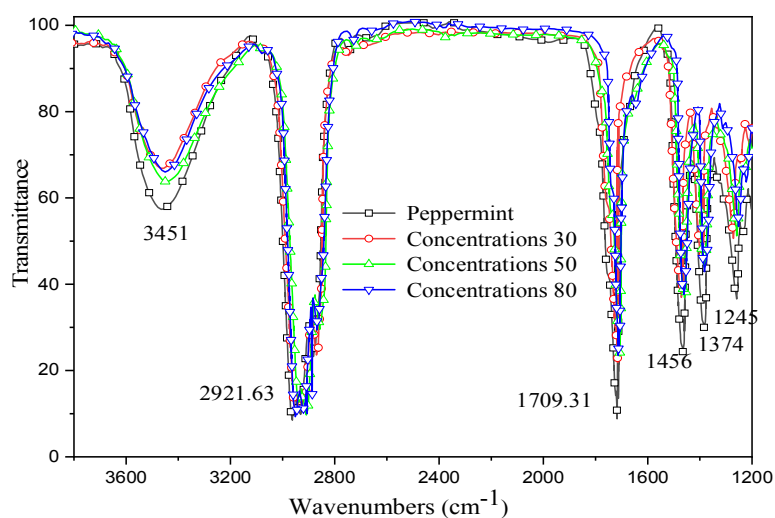
شکل ۱: طیف مادون قرمز نعناع فلفلی خالص با سه تکرار.

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

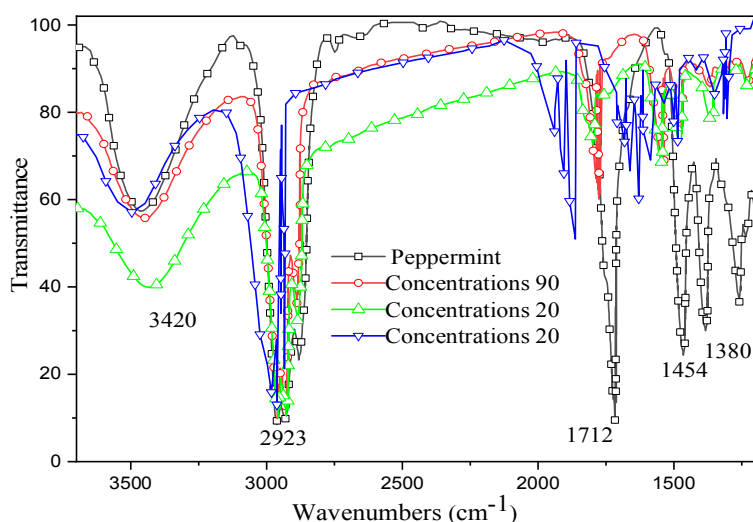
برای مقایسه خلوص نعناع فلفلی اصل از تقلبی (اسانس رقیق شده با حلال)، طیف مادون قرمز غلظت‌های ۳۰، ۵۰ و ۸۰ درصد گرفته شد و با نمونه خالص مورد مقایسه قرار گرفت.

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

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



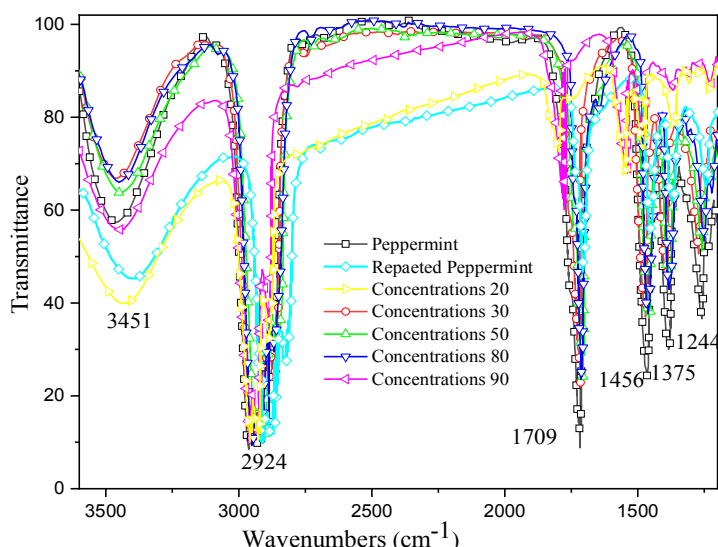
شکل ۲: طیف مادون قرمز نمونه‌ها با غلظت ۳۰، ۵۰، ۸۰ درصد و نمونه خالص.



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

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

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



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

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

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

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

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

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

جدول ۱: ضریب شکست اسانس نعناع فلفلی با غلظت‌های مختلف

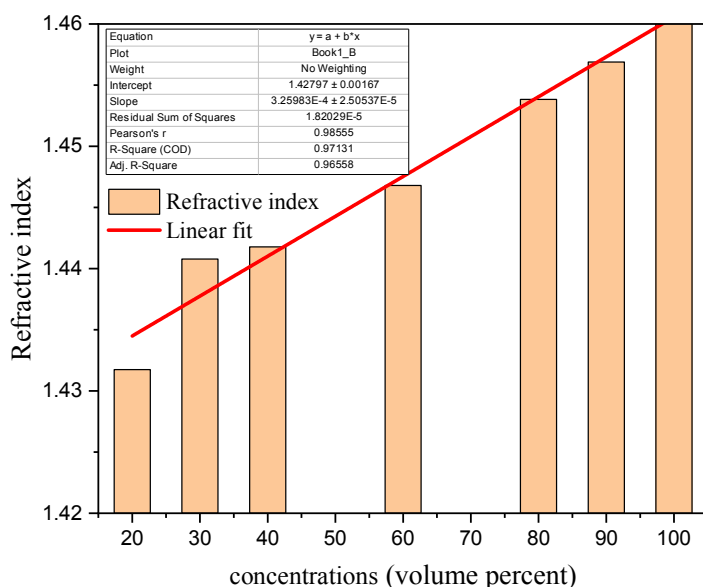
ضریب شکست		غلظت اسانس (درصد)
دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد	دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد	
1/4317	1/4285	۲۰
1/4407	1/4275	۳۰
1/4417	1/4385	۴۰
1/4468	1/4436	۶۰
1/4538	1/4506	۸۰
1/4568	1/4536	۹۰
1/4609	1/4576	۱۰۰

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

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

در فرمول ۱ ضریب شکست در دمای ۲۰ درجه





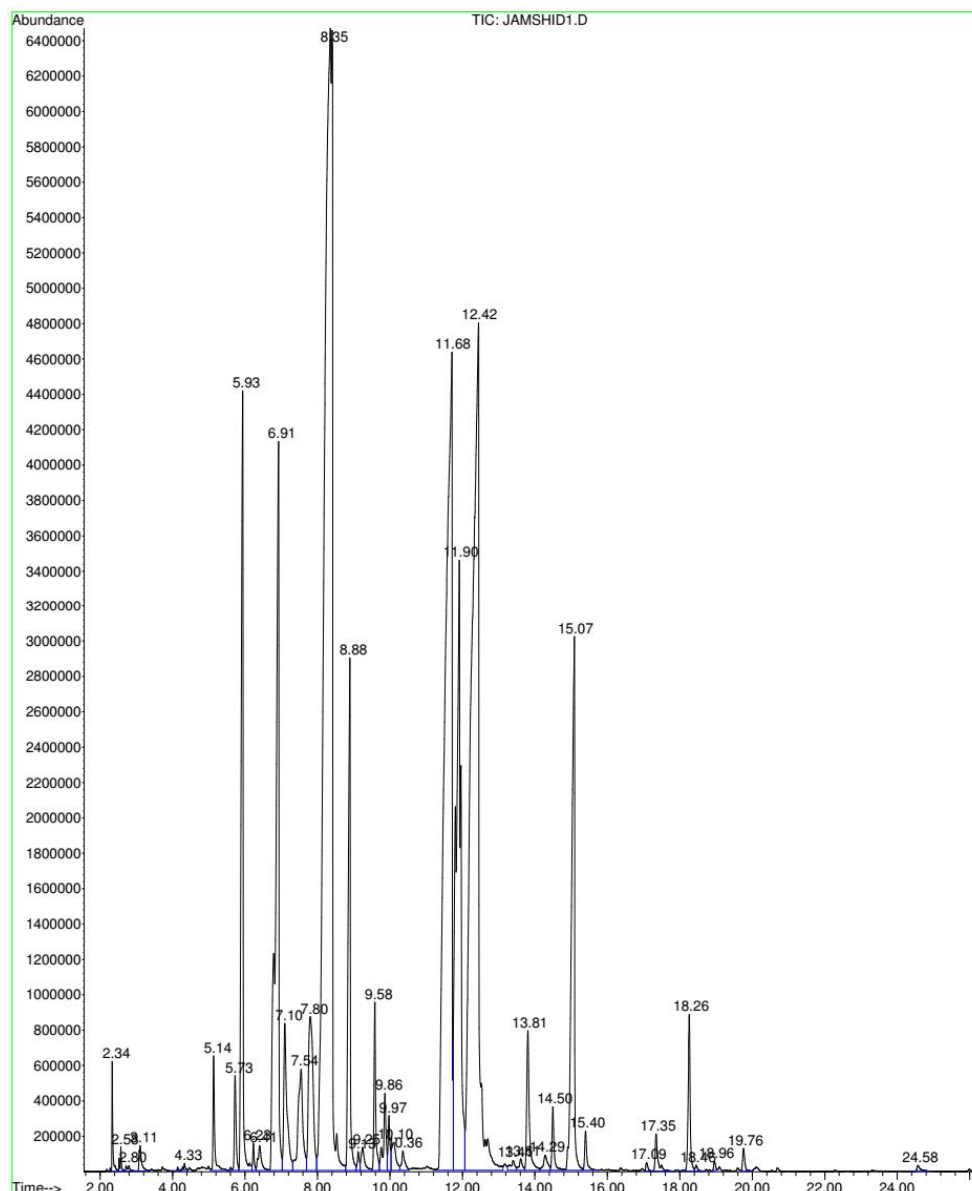
شکل ۵: منحنی تغییرات ضریب شکست غلظت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی.

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

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

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

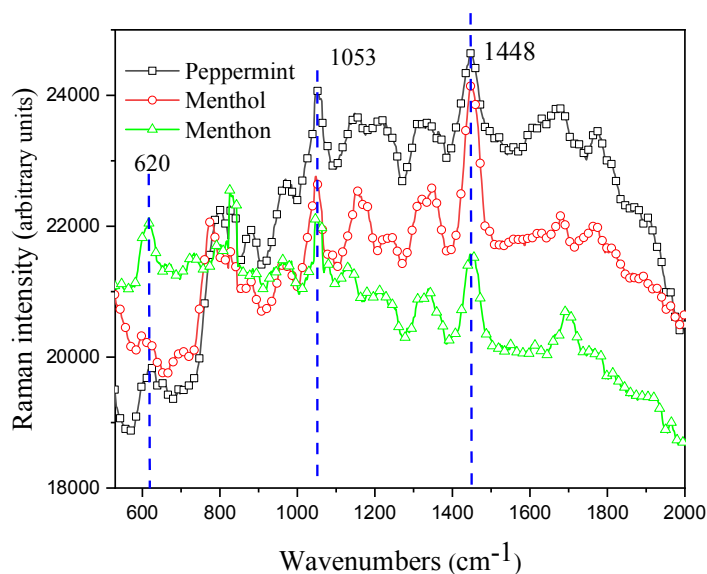
طیف‌سنجی رامان: برای مشخص شدن اجزاء اسانس از دستگاه کروماتوگرافی استفاده شد. شکل ۶ نمودار کروماتوگرام نعناع فلفلی را نشان می‌دهد که نتایج آن در جدول شماره ۲ آورده شده است. با توجه به نتایج این آنالیز اسانس نعناع فلفلی مورد آزمون شامل ۴۰ ترکیب می‌باشد. در میان این ۴۰ ترکیب، متون، منتول و دی‌لیمونن اجزای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



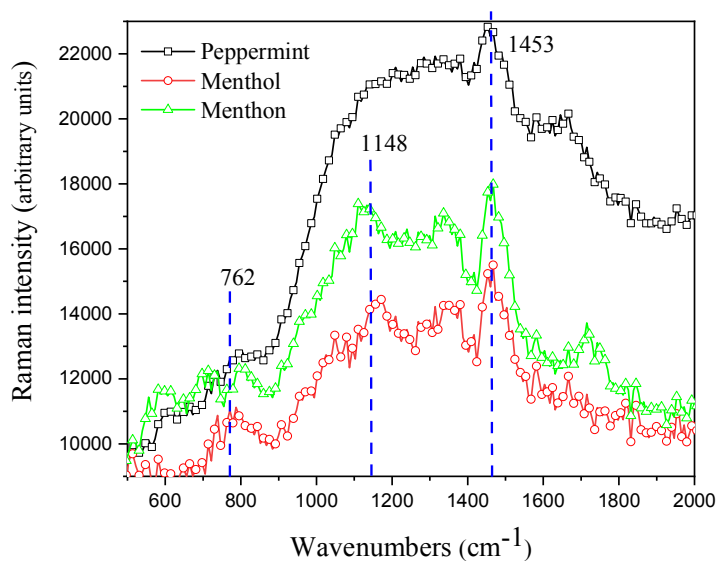
شکل ۶: نمودار کروماتوگرام نعنای فلفلی.

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

گفت که قله‌های ۱۴۴۸ و ۶۲۰ بر سانتی‌متر را به عنوان مشخصه‌های منتول و منتون در نظر گرفته شود، بنابراین طیف‌سنجی رامان به خوبی قادر به مشخص کردن منتون و منتول در یک نمونه مجهول خواهد بود. برای اطمینان پیدا کردن از نتیجه این آزمایش با دو طیف‌سنج دیگر آزمایش تکرار شد و از طیف‌سنج رامان ساخت شرکت طیف‌سنج تجهیز پیشرفته استفاده شد.



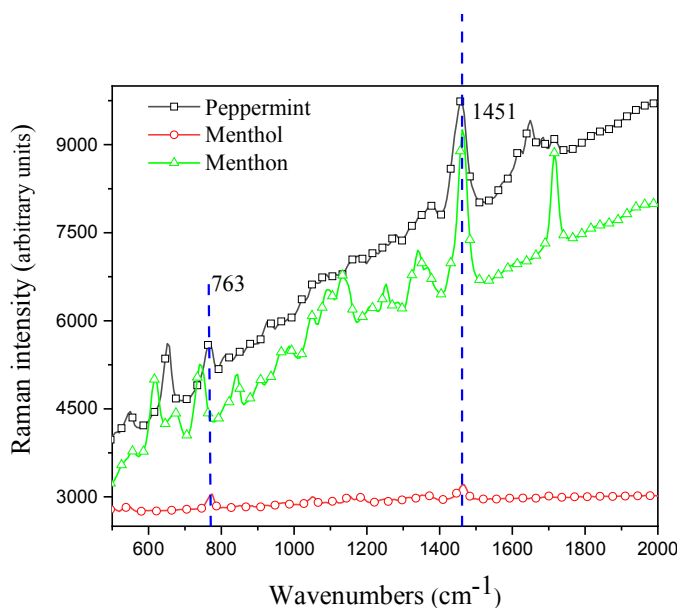
شکل ۷: طیف رامان نمونه‌های منتون، منتول و اسانس نعناع فلفلی توسط طیف‌سنج ASEQ ساخت کشور کانادا.



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

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

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



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

همانطور که در طیف رامان شکل ۹ مشاهده می‌شود یک قله قوی در  $1451$  برسانتی متر و یک قله نسبتاً ضعیف در  $769$  برسانتی متر وجود دارد. به وضوح مشخص است که مشخصه اصلی ترکیب منتون پیک  $1451 \text{ cm}^{-1}$  است و مشخصه اصلی ترکیب منتول پیک  $769 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد، بر طبق تحقیقاتی که گروه‌های دیگر بر روی نمونه اسانس نعناع فلفلی انجام داده‌اند. یک قله در  $1457 \text{ cm}^{-1}$  به‌طور خاص مربوط به منتون و یک قله قوی در  $769 \text{ cm}^{-1}$  به منتول مربوط ساخته‌اند (Jentzsch et al., 2015). اکنون با اطمینان می‌توان گفت که طیف‌سنجی رامان به خوبی قادر به مشخص کردن منتون و منتول در یک نمونه مجهول می‌باشد. در جدول ۳ قوی‌ترین قله‌های مشاهده شده با طیف‌سنج‌های مختلف برای ترکیبات منتون، منتول و نمونه اسانس برای مقایسه آورده شده است. همانطور که مشخص است قله مشخصه برای منتون در محدوده  $1448$  تا  $1457$  برسانتی متر می‌باشد و برای منتول در محدوده  $620$  تا  $769$  برسانتی متر اتفاق می‌افتد.

جدول ۳: نتایج آنالیز ۳ مدل طیف‌سنجی رامان متفاوت. قوی‌ترین قله‌ها (برسانتی متر)

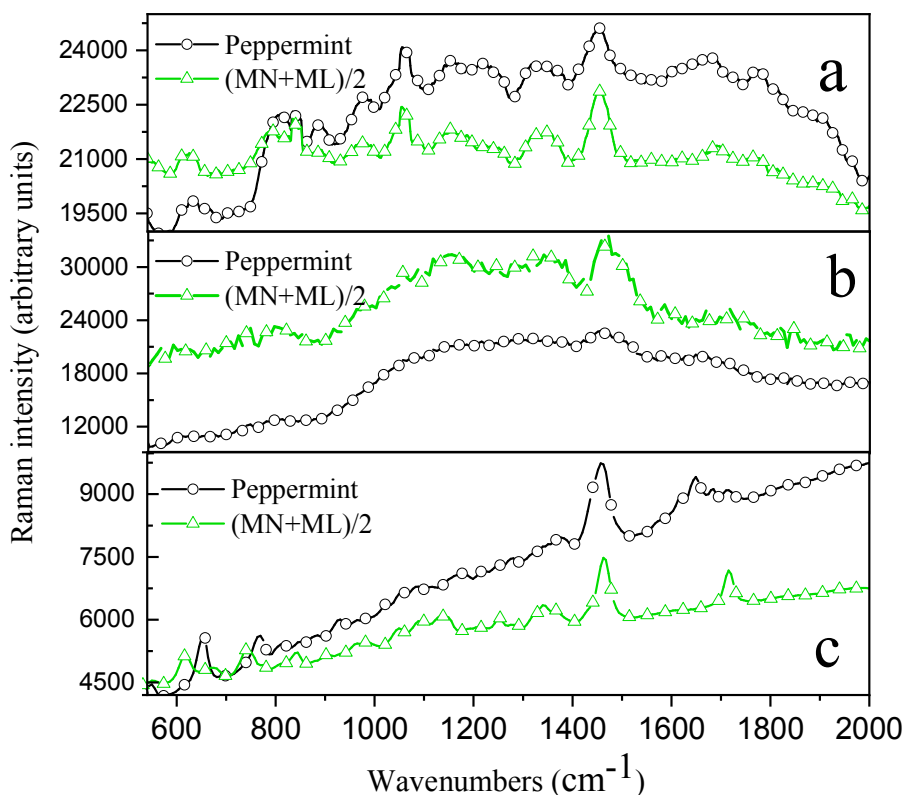
جدول ۳: نتایج آنالیز ۳ مدل طیف‌سنجی رامان متفاوت.			
قوی‌ترین قله‌ها (برسانتی متر)			
مدل طیف‌سنج	منتون	منتول	اسانس
ASEQ	1448	620	1448
تجهیز پیشرفته	1453	762	1460
تکسان	1451	769	1457
(Jentzsch Paul et al., 2015)	1457	769	1457

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

با مقایسه سه طیف سنج مورد استفاده شده در این تحقیق مشخص است که طیف‌های گرفته شده توسط

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

با طیف سنج رامان شرکت تجهیز پیشرفته کیفیت پایینی دارد و همانطور که مشخص است پیک ها را پهن نشان می دهد بنابراین قدرت تفکیک خوبی ندارد ولی تقریباً فلورسانس کاهش یافته است. در طیف های گرفته شده با طیف سنج ASEQ مشخص است که تغییرات نرم افزاری روی طیف ها اعمال نشده است و طیف ها کاملاً دارای فلورسانس هستند ولی قدرت تفکیک این دستگاه نسبتاً زیاد است. با اینکه برای هر سه طیف سنج جواب های متفاوتی به دست آمد اما هر سه طیف سنج پیک های منتون و منتول را نشان می دهند پس از هر طیف سنجی که استفاده شود و پیکی در این محدوده ها داشته باشد می تواند اسانس نعنای فلفلی را مشخص کند. اکنون برای اطمینان از



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

## بحث

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

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

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

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

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

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

1. Silvia Imre

اثبات کیفیت اسانس های تجاری مورد استفاده قرار گیرد.

### نتیجه گیری نهایی

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

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

دقیوچه<sup>۲</sup> و همکاران (Daghbouche, et al., 2018) در الجزایر با استفاده از طیفسنجی مادون قرمز (FTIR) برای کنترل سریع کیفیت اسانس های تجاری از اسانس های خالص تحقیق کردند. ۴۷ نمونه از بازار الجزایر و اسپانیا خریداری کردند و مستقیماً، بدون هیچگونه آماده سازی قبلی، با طیفسنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (ATR-FTIR) اندازه گیری انجام شد. اسانس خالص با روش های آب و بخار استخراج شد و طیف ATR آن ها را به دست آوردند. نتایج موجود نشانگر وجود حلال ها در برخی فرمولاسیون های تجاری و تأیید هویت سریع اسانس های خالص به راحتی از آن هایی که رقیق شده اند. روش پیشنهادی یک روش سریع و سازگار با محیط زیست ارائه می دهد که می تواند به عنوان جایگزینی برای روش های کروماتوگرافی متداول برای

2. Daghbouche
3. Absorb total reflection

داشته باشد.

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

## References

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



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