



## بررسی اثر قطبیت حلال‌های مختلف و زمان جهت استخراج ترکیبات مؤثره عصاره پوست لیمو ترش با امواج فراصوت

زهرا لطیفی<sup>۱\*</sup>، مرتضی علیپور<sup>۲</sup>، معصومه زیبایی<sup>۳</sup>، زینب عبداللهی چله‌بری<sup>۴</sup>، زهرا غفوری<sup>۵</sup>، تارا قربانی پیرشهید<sup>۶</sup>

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران.

۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران شمال، ایران.

۵- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۶- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳

کلمات کلیدی:

اولتراسوند،

استخراج،

ترکیبات زیست فعال،

عصاره پوست لیموترش.

فرآیند اولتراسوند، روش غیرحرارتی مؤثر در استخراج بوده و استفاده از آن با توجه به اثرات مؤثرش در نگهداری و فرآیند مواد غذایی، روبه افزایش می‌باشد. مقایسه حلال‌های مختلف در بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره با امواج فراصوت از عصاره پوست لیموترش هدف این تحقیق می‌باشد؛ ضمن اینکه تا بحال مطالعات زیادی روی پوست لیمو ترش صورت نگرفته و بیشتر روی پرتقال و سایر مرکبات تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است و همین امر دلیلی جهت انجام این تحقیق گردید. در این روش برای ارزیابی میزان استخراج فنول و فلاونوئید و ارزیابی قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، از سه حلال آب، اتانول ۷۰ درصد و متانول ۸۰ درصد استفاده شد سپس بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات یاد شده در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه مورد مقایسه قرار گرفت. نرم‌افزار مورد استفاده برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها SPSS بود. بر اساس نتایج، قوی‌ترین و ضعیف‌ترین حلال برای استخراج ترکیبات زیست فعال به ترتیب، اتانول ۷۰ درصد و آب بود که ۴/۶۱ و ۳/۷۴ میلی‌گرم معادل کوئرستین به گرم گالیک به گرم نمونه خشک ترکیبات فنولی، ۸۷/۴۶۸ و ۷۰/۲۳۱ درصد قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان داد. در حلال اتانول ۷۰ درصد اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه برای استخراج ترکیبات مؤثره مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) و زمان‌های ۹۰ و ۳۰ دقیقه به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان استخراج ترکیبات یاد شده را داشت. در هر روش استخراج، میزان استخراج ترکیبات زیست فعال بسته به نوع حلال متفاوت بود و حلال اتانول ۷۰ درصد، بهترین روش استخراج عصاره بود.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.1

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.1.3

\* مسئول مکاتبات:

yasamin.latifi131@yahoo.com

## ۱- مقدمه

عصاره‌های گیاهی مرکب از چندین ترکیب و درجه غلظت ممکن هستند که از مواد گیاهی خشک شده با تقطیر بخار، فشار سرد یا استخراج حلال بدست می‌آیند. متداول‌ترین فرآیندهای مورد استفاده برای استخراج نیز ممکن است شامل خیساندن<sup>۱</sup>، دم کردن<sup>۲</sup>، جوشاندن<sup>۳</sup>، هضم<sup>۴</sup>، تراوش<sup>۵</sup>، تقطیر<sup>۶</sup> و خشک کردن<sup>۷</sup> باشد (۱). اسانس‌ها (EO)<sup>۸</sup> مایعات روغنی معطر هستند که مخلوطی از ترکیبات فرار با وزن مولکولی پایین مانند ترپنوئیدها، فینیل پروپانوئیدها و ترکیبات حاوی گوگرد و ازت تشکیل شده‌اند. علاوه بر روش‌های سنتی، روش‌های نوین استخراج مانند اولتراسوند<sup>۹</sup>، مایکروویو<sup>۱۰</sup> و استخراج با سیال فوق بحرانی<sup>۱۱</sup> مورد بررسی قرار گرفته است [۲]. در عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها، ترکیبات یافت شده در غلظت‌های بالا و دارای فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولیک نظیر تیمول، اوژنول، کارواکرول و همچنین ترکیباتی مانند لینالول، ساینین، منتول، میرسن و کامفن هستند [۳ و ۴]. که ویژگی‌های ضد میکروبی و ضد قارچی آن‌ها را تأیید می‌کند. گیاهان و ترکیبات آن‌ها بالاترین منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را فراهم می‌کنند. میوه‌ها، سبزیجات، ادویه‌ها، گیاهان، غلات، حبوبات، روغن‌ها، دانه‌ها و چای‌ها منابع مهمی از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی بویژه ترکیبات فنولی هستند. ترکیبات فنولی به فنول‌های ساده، اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسی سینامیک، تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها طبقه‌بندی می‌شوند. عملکرد بسیاری از ترکیبات فنولی به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی توسط محققین گزارش شده است [۵]. ترکیبات فنولیک گروه مهم دیگری از آنتی‌اکسیدان است که بطور طبیعی در قلمرو گیاهان وجود دارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی از ساختارهای منحصر به فرد آنها ناشی می‌شود، که توانایی اهدای هیدروژن بالایی را برای بسیاری از ترکیبات دیگر ارائه می‌دهند. فنولیک‌ها از جمله اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و لیگنان‌ها

به عنوان مهارکننده‌های رادیکال آزاد، شلاته کننده‌های فلزی، عوامل کاهش دهنده و هم‌افزایی عالی نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌ها عمل می‌کنند و بنابراین پتانسیل زیادی در مهار اکسیداسیون در مواد غذایی و سیستم‌های بیولوژیکی نشان می‌دهند. عصاره‌های گیاهی متنوعی که حاوی مجموعه گسترده‌ای از ترکیبات فنلی هستند، به دلیل ترکیبات، کارایی آنتی‌اکسیدان و کاربرد بالقوه آن‌ها در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی مورد بررسی قرار گرفته است [۶].

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال آزاد و ممانعت از ادامه اکسیداسیون، از فساد و تغییر رنگ و تند شدن چربی‌ها جلوگیری می‌کنند. به خصوص آنتی‌اکسیدان‌هایی که بنیان حلقوی فنولی حاوی گروه OH را دارا می‌باشند، نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها دارند [۷]. ویژگی‌های سلامت بخش آنتی‌اکسیدان‌ها و نقش آن‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها، دلایل عمده استفاده بالا از آنها می‌باشد. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها از فرآیند اکسیداسیون که از عوامل بروز بیماری‌هایی همچون سرطان است پیشگیری کرده و از این جهت اثرات خود را بر سلامت انسان می‌گذارند [۸]. آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است اثر مهارکنندگی خود را در برابر اکسیداسیون از طریق مکانیسم‌های مختلف و با فعالیت‌های متنوع اعمال کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است بطور گسترده‌ای بر اساس نحوه عملکرد خود به آنتی‌اکسیدان‌های اولیه که واکنش زنجیره اکسیداسیون را با مهار واسطه‌های رادیکال آزاد شکسته می‌شوند، و آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه که با ممانعت یا تأخیر اکسیداسیون با تعویق مرحله آغازین اکسیداسیون یا شتاب دادن یا بازسازی آنتی‌اکسیدان‌های اولیه، طبقه‌بندی شوند. آنتی‌اکسیدان‌های اولیه مانند بیشتر ترکیبات فنلی قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد با اهدای یک اتم هیدروژن هستند، همانطور که در رابطه زیر مشاهده می‌شود [۶]. گیاهان و ترکیبات آن‌ها بالاترین منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را فراهم می‌کنند. میوه‌ها، سبزیجات، ادویه‌ها، گیاهان، غلات، حبوبات، روغن‌ها، دانه‌ها و چای‌ها منابع مهمی از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی بویژه ترکیبات فنلی هستند. بنابراین تلاش برای جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی منجر به بررسی آنتی‌اکسیدان‌هایی از منابع گیاهی شد [۹].

لیمو ترش از خانواده *Rutaceae* و با نام علمی *Citrus lemon L.* یکی از گیاهان دارویی می‌باشد که عمدتاً بخاطر ترکیبات آلكالوئیدی موجود در آن پرورش داده می‌شوند.

1. maceration
2. infusion
3. decoction
4. digestion
5. percolation
6. distillation
7. drying
8. Essential oils
9. Ultrasonic
10. Microwave
11. Supercritical Fluid Extraction

میوه لیمو ترش (*Citrus aurantifolia*) در نیمه دوم خرداد ۱۳۹۸ به تعداد ۳۰ عدد بصورت تصادفی و از نظر اندازه یکسان و بدون هرگونه لک و آسیبی بر روی پوست انتخاب شده و از بازار محلی در شهرستان رشت تهیه شد. پس از انجام مراحل پاکسازی و حذف هر گونه آلودگی از لیموهای تهیه شده، با رعایت مقررات و ضوابط بهداشتی قسمت خارجی پوست لیمو به وسیله چاقو به قطعات کوچک برش داده و به مدت یک روز (۲۴ ساعت) در آون (شرکت بهداد، مدل ۳۴۹۴، ساخت کشور ایران) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پوست لیموهای خشک شده توسط آسیاب برقی به پودری با ذرات کاملاً ریز تبدیل شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای فریز (۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. تمام مواد شیمیایی از جمله معرف فولین سیوکالتیو، کربنات سدیم، اسید گالیک، آلومینیوم کلرید، پتاسیم استات، معرف کوئرستین، معرف DPPH، بافر فسفات و حلال‌های مورد استفاده (متانول و اتانول) با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

## ۲-۲- استخراج به کمک حمام فراصوت

به منظور بررسی اثر قطبیت حلال، عملیات استخراج با حلال‌هایی با قطبیت متفاوت انجام شد. در این روش حلال‌های آب، متانول ۸۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد بطور جداگانه با نمونه‌های ۲۰ گرمی پودر خشک شده پوست لیموترش به نسبت ۱:۱۰ مخلوط شدند و سپس مخلوط‌های بدست آمده در حمام اولتراسوند (Tecno-Gas.S.P.A، ایتالیا) برای زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰ و ۹۰ کیلوهرتز) قرار گرفتند. سپس عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره سه صاف شدند [۱۷]. دما در طی فرآیند عصاره‌گیری با استفاده از حمام آب (memmert WNB Germany 14) ثابت نگه داشته شد و به منظور کنترل دما از دماسنج استفاده گردید. عصاره استخراج شده با ۷۸۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (SiGmA2-16P, Germany) و سپس قسمت شفاف بالای مخلوط جدا گردید. جداسازی حلال و تغلیظ شدن عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلأ (Hei-VAP Value, Germany Beals) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (با هدف جلوگیری از آسیب ترکیبات فنولی) و ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر

فلاونوئیدهای موجود در جنس *Citrus* دارای اثرات زیستی متعددی مانند ضددیابت، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضد ویروسی می‌باشند [۱۰]. پوست مرکبات به عنوان ضایعات (محصول جانبی) آبیگری از مرکبات مطرح هستند [۱۱]. پوست میوه لیمو منبع غنی از فلاونوئیدهای گلیکوزیدی، کومارین، گلیکوزیدها، بتا و گاما سیتوسترول و روغن‌های فرار می‌باشد [۱۲].

روش‌های سنتی استخراج همچون روش غرقابی نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیادی دارند، بنابراین نیاز به روش‌های استخراج جدید با زمان استخراج کوتاه‌تر، مصرف حلال آلی کمتر و ایجاد آلودگی کمتر، افزایش یافته است. روش‌های استخراج جدید مانند استخراج به کمک فراصوت و استخراج به کمک مایکروویو از روش‌های سریع و مؤثر برای استخراج ترکیب‌های مؤثره از بافت گیاهی هستند [۱۳]. امروزه استفاده از امواج فراصوت با توجه به اثرات مؤثر آن در نگهداری و فرآیند مواد غذایی رو به گسترش می‌باشد. اثرات مکانیکی امواج فراصوت و پدیده کاویتاسیون ایجاد شده در اثر این امواج، سبب افزایش نفوذپذیری حلال به داخل سلول‌های گیاهی، افزایش انتقال جرم و به دنبال آن افزایش بازدهی استخراج در دماهای پایین‌تر می‌شود [۱۴]. کاربرد روش فراصوت در شرایط آزمایشگاهی بطور وسیعی برای استخراج ترکیبات مؤثره گیاهان بررسی شده است و بر اساس مطالعات انجام شده، فراصوت می‌تواند بازدهی استخراج مواد مؤثره را افزایش دهد [۱۵]. قاسمی و همکاران (۱۳۸۸) با بررسی تعیین میزان فلاونوئیدها در بافت و پوست لیمو، هسپریدین را فلاونوئید غالب در میوه با ۳/۲۳ درصد ماده خشک و پس از آن نارنجین با ۱/۶۳ درصد ماده خشک گزارش کردند. لازم به ذکر است که بیش‌ترین میزان آنها در پوست میوه یافت شد [۱۶]. در این پژوهش اثر نوع حلال و زمان‌های مختلف در روش استخراج به کمک حمام فراصوت، بر میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH از پوست میوه لیموترش مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه میوه و مواد شیمیایی

مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. کوئرتستین به عنوان استاندارد با غلظت‌های مختلف (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۸۰) برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد [۱۹].

$$\text{جذب در } 415 \text{ نانومتر} = 0.0237 X + 0.0867$$

## ۲-۵- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون

### DPPH

اندازه‌گیری توانایی عصاره در مهار رادیکال‌های آزاد به این صورت انجام شد که یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) افزوده و مخلوط به دست آمده به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید که در آن  $A_S$  و  $A_C$  به ترتیب جذب نمونه و جذب کنترل منفی می‌باشند. نمونه کنترل منفی حاوی ۳ میلی‌لیتر متانول به همراه ۱ میلی‌لیتر معرف DPPH بود [۲۰].

$$\text{DPPH آزاد} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

## ۲-۶- اندازه‌گیری اسید آسکوربیک

اسید آسکوربیک با روش تیتراسیون ۲،۶-دی کلروفنل ایندوفنول تعیین شد. اسید آسکوربیک با استفاده از محلول اسید استیک (۷۰٪) و اسید متافسفریک (۳۰٪) استخراج شد. عصاره‌ها با آب مقطر به داخل یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و با آب به حجم رسانده و به سرعت توسط کاغذ صافی صاف شدند. ویتامین ث معرف رنگی دی کلروفنل ایندوفنول را که یک معرف اکسیداسیون و احیا است را به محلول بی‌رنگ تبدیل میکند. در نقطه پایانی آزمایش شناساگر رنگی احیاء نشده در محلول اسید به رنگ ارغوانی گلی می‌باشد در نهایت یک میلی‌لیتر از این محلول توسط معرف ۲،۶-دی کلروفنل ایندوفنول تیتراسیون گردید. به ترتیب که قطره قطره از این معرف به محلول اضافه شد و هنگامی که رنگ صورتی بدست آمد تا ۱۵ ثانیه ثابت ماند. در این زمان عمل تیتراسیون متوقف شد و میزان اسید آسکوربیک از طریق

روی پلیت پخش گردید و در داخل آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا زمانی که عصاره بطور کامل خشک گردید. سپس درب پلیت را گذاشته، دور آن را با پارافیلیم بسته و برای جلوگیری از نفوذ نور بطور کامل با فویل آلومینیومی پوشانده شد و تا زمان انجام آزمون در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

## ۲-۳- اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. بطور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره (قبل از خشک کردن) با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتیو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به آنها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS (Shimadzu، مدل UV-2600، ساخت کشور ژاپن) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک با غلظت‌های مختلف (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰) استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه شد بدین طریق که مقدار  $X$  محاسبه گردید (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، سپس عدد حاصل در حجم حلال مصرفی (۳ میلی‌لیتر) ضرب و سپس ضربدر ۱۰۰۰ (جهت تبدیل گرم به میلی‌گرم) و سپس تقسیم بر مقدار اولیه گیاه (۱/۲ میلی‌گرم) گردید بدین صورت واحد حاصل نهایی میلی-گرم بر گرم عصاره بیان شد (۱۸).

$$\text{جذب در } 765 \text{ نانومتر} = 1/855 X + 2/81$$

## ۲-۴- اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات

### فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی هر عصاره به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره (قبل از خشک کردن) درون لوله آزمایش در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آن اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آنها اضافه گردید و به

بیشترین و کمترین مقدار کل ترکیب‌های فنولی را دارا بودند و هر سه حلال اختلاف معنی‌داری در استخراج با هم داشتند ( $p < 0/05$ ). همچنین اثر اصلی سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار DPPH به ترتیب مربوط به اتانول و متانول بود و میان سه حلال، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $p < 0/05$ ). استخراج پلی‌فنول‌ها از مواد گیاهی تحت تأثیر حلالیت ترکیبات فنولی موجود در حلال مورد استفاده برای فرآیند استخراج است. تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف، به تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده بستگی دارد و قطبیت حلال‌های مورد استفاده نقش کلیدی در افزایش حلالیت این ترکیبات بازی می‌کنند [۲۴-۲۲]. علاوه بر این، قطبیت حلال نقش اساسی در افزایش محتوای فنولی عصاره‌ها دارد [۲۵].

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار فلاونوئید تیمارهای مختلف، مشاهده شد که اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند ( $p < 0/05$ ) و در مورد ترکیبات فلاونوئیدی در سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول بود که با حلال‌های آب و متانول ۸۰ درصد تفاوت معنی‌داری از نظر میزان استخراج داشتند ( $p < 0/05$ ) ولی حلال‌های متانول و آب از نظر میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ( $p > 0/05$ ) (جدول ۱).

فرمول محاسبه و بصورت گرم در لیتر محاسبه و سرانجام بصورت میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گزارش شد [۲۱].

$$W \times 100 / 100 = \text{اسید آسکوربیک } (\%)$$

$W =$  حجم معرف مصرف شده در تیتراسیون

## ۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

در روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل، میزان به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و میزان ترکیبات فلاونوئیدی کل، مقایسه میانگین‌های بدست آمده از سه تکرار با آزمون دانکن ( $p < 0/05$ ) بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی گرفت. نرم‌افزار مورد استفاده برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها SPSS نسخه 16.0 بود.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- تأثیر قطبیت حلال‌های مختلف بر استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و DPPH با حمام فراصوت

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی تیمارهای مختلف ارائه شده در جدول (۱)، مشاهده شد که اثرات اصلی سطوح مختلف، پارامترهای حلال و زمان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند ( $p < 0/05$ ). در بین حلال‌های مصرفی (اثر اصلی) اتانول و متانول به ترتیب

**Table 1** Compare the average extraction combinations of Phenolic and Flavonoid and power inhibitory DPPH free radical by different solvents in ultrasound bath method

Treatment (solvent)	Phenolic combinations (mg GAE/g dry sample)	Flavonoid combinations (mg QE/g dry sample)	% of DPPH free radical scavenging
water	6.95 <sup>b</sup>	3.74 <sup>b</sup>	70.213 <sup>b</sup>
Ethanol 70%	8.202 <sup>a</sup>	4.61 <sup>a</sup>	87.468 <sup>a</sup>
Methanol 80%	6.294 <sup>c</sup>	3.92 <sup>b</sup>	68.051 <sup>c</sup>

Dissimilar Characters represents significant difference in 5% chance level.

کرده است [۲۷]. محققین تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده مربوط می‌دانند. استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد [۱۷ و ۲۴-۲۲]. حلالیت ترکیبات فنولی بسته به نوع، حلال، درجه پلیمریزاسیون آنها و برهم‌کنش آنها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است. در کل حلال‌های اتانول و متانول بصورت مخلوط با آب توانایی

پژوهش‌های زیادی افزایش میزان ترکیبات فنولی به وسیله امواج فراصوت را در مقایسه با روش‌های متداول بیان کردند. یاکین و جیان در سال ۲۰۰۹ ضمن بررسی روند استخراج ترکیبات فنولیک از نارنگی بیان داشتند که استفاده از فراصوت باعث افزایش استخراج ترکیبات فنولیک نسبت به روش خیساندن شده است [۲۶]. همچنین روش فراصوت ترکیبات فنولیک بیشتری را بر حسب اسید تانیک نسبت به روش استخراج غرقابی، استخراج

نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش مقدار ترکیب‌های فنولی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH گردید و افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۲). اما در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه از لحاظ آماری در مقایسه با زمان ۶۰ دقیقه معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). افزایش راندمان با افزایش زمان احتمالاً به دلیل بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت است. همچنین افزایش زمان، مدت زمان انتقال جرم را افزایش می‌دهد، بنابراین روند صعودی استخراج عصاره با افزایش زمان کاملاً منطقی به نظر می‌رسد.

در پژوهشی دیگر، فاله و همکاران (۲۰۱۲) نیز دریافتند عصاره اتانولی قدرت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به عصاره متانولی دارد [۳۴]. علت افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و DPPH با افزایش زمان فراصوت را می‌توان به پدیده کاویتاسیون نسبت داد که در واقع در اثر انتشار امواج صوتی در فاز جامد-مایع، چرخه‌های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد می‌شود که باعث تشکیل حباب‌هایی شده که این حباب‌ها در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. این عمل باعث نوسان ذرات جامد و مایع شده و تحت عمل فراصوت سرعت پیدا می‌کنند. در نتیجه مواد حل شونده سریع‌تر از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می‌کنند. علاوه بر این، دیگر اثرها مانند امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می‌کند. البته در زمان‌های بالاتر ممکن است به دلیل وقوع اکسیداسیون (به علت قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت) میزان استخراج کاهش یابد [۳۵]. در بهینه‌سازی روش استخراج به کمک اولتراسوند، زمان استخراج به میزان زیادی مقدار ترکیب‌های فنولی عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار داد، از این‌رو میزان استخراج ترکیب‌های فنولی از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه بطور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ) ولی از ۳۰ تا ۵۰ دقیقه تقریباً ثابت بود [۳۶].

شریفی و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر زمان بر روی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در روش فراصوت را معنی‌دار اعلام کردند ( $p < 0.05$ ) و دریافتند با افزایش مدت زمان استخراج تا حد خاصی قدرت مهارکنندگی افزایش یافته است که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد [۳۷].

بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنولی از بافت‌های گیاهی دارند [۲۸]. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که بالا بودن ترکیبات فنولی، دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌ها از جمله عصاره‌های قطبی می‌باشد زیرا براساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد. از طرف دیگر نظر به می‌رسد که ترکیبات فنولی که بصورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند بیش‌تر از طریق عصاره‌های گیاهی آنها قابل استخراج باشد [۲۹]. ترکیبات فنولی با توجه به حلالیت که در اثر قطبیت آنها ایجاد می‌شود، در سلول توزیع می‌شوند. مواد آبدوست عمدتاً در واکوئل‌های سلولی یافت می‌شوند، در حالی که مواد دیگری مانند اکثر لیگنین‌ها، فلاونوئیدها و پلی-فنول‌های نامحلول در آب از طریق پیوندهای آبریز با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها در دیواره سلول رسوب می‌کنند [۳۰]. به همین دلیل است که حلال استخراج باید با توجه به محلول بودن ترکیباتی که فرآیند به آنها هدایت می‌شود، انتخاب شود. حلال‌هایی مانند متانول یا اتانول در مقایسه با آب دارای قطبیت کمتری هستند و این امر با کاهش ثابت دی‌الکتریک حلال، باعث حل شدن و انتشار ترکیبات فنولی می‌شود [۳۱]. حلالیت ترکیبات فنولی در حلال‌های مختلف نمی‌تواند فقط براساس قطبیت آنها باشد زیرا حلالیت به پارامترهای مختلفی از جمله استرئوشیمی<sup>۱</sup> (شیمی فضایی) ترکیبات (نسبت قطبی و غیرقطبی مولکول) و نیروهای بین مولکولی بین آنها و حلال مرتبط است [۳۲]. خصوصیات فیزیکی حلال بر ایجاد حفره بسیار تأثیر می‌گذارد، زیرا حفره‌ها هنگام استفاده از حلال فشار بالا با گرانش کم و کشش سطحی کم به راحتی ایجاد می‌شوند [۳۳].

### ۳-۲- تأثیر زمان‌های مختلف بر استخراج

#### ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و DPPH

#### حمام فراصوت

در سطوح مختلف زمان (اثر اصلی)، اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ۳۰ و ۶۰ و ۹۰ دقیقه مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) و زمان ۳۰ دقیقه کم‌ترین میزان ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را داشت (جدول ۲).

1. stereochemistry

**Table 2** Compare the average extraction combinations of Phenolic and Flavonoid and power inhibitory DPPH free radical in different times in ultrasonic bath method

Treatment time (minute)	Phenolic combinations (mg GAE/g dry sample)	Flavonoid combinations (mg QE/g dry sample)	% of DPPH free radical scavenging
30	4.74 <sup>c</sup>	2.589 <sup>b</sup>	59.175 <sup>c</sup>
60	5.69 <sup>b</sup>	4.722 <sup>a</sup>	66.64 <sup>b</sup>
90	6.92 <sup>a</sup>	6.11 <sup>a</sup>	79.254 <sup>a</sup>

Dissimilar Characters represents significant difference in 5% chance level.

(۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) و حلال‌های مختلف (آب، اتانول و متانول)، اختلاف معنی‌داری میان هر حلال در زمان‌های مختلف مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ) و طبق نتایج ارائه شده در جدول (۳) میزان ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در حلال آب با افزایش زمان استخراج کاهش معنی‌داری وجود داشت ( $p < 0.05$ ). اما در مقابل در حلال‌های اتانول و متانول نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش مقدار ترکیب‌های فنولی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH گردید و افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد ( $p < 0.05$ ). از این رو نوع حلال و زمان استخراج بکار برده شده می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر استخراج ترکیبات مؤثره پوست لیمو ترش داشته باشند.

در تحقیق کمالی و همکاران در سال ۲۰۱۵، میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از میوه سنجد زیتنی (*Elaeagnus umbellata*) با دو روش حمام و پراب فراصوت از سه سطح زمان (۳۰ و ۶۰ و ۹۰) دقیقه برای حمام فراصوت و سه سطح زمان (۵ و ۱۰ و ۲۰) دقیقه برای پراب فراصوت استفاده کردند و دریافتند در هر دو روش با افزایش زمان، درصد مهار رادیکال آزاد افزایش یافت که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد [۳۸].

### ۳-۳-۳ اثر متقابل زمان استخراج و حلال بر استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و DPPH با حمام فراصوت

در بررسی اثر متقابل زمان استخراج در سطوح مختلف

**Table 3** Compare the average extraction combinations of Phenolic and Flavonoid and power inhibitory DPPH free radical obtained by the extraction from sour lemon peel in ultrasonic bath method for 30, 60 and 90 min using solvents of different polarity

Treatment (solvent)	Treatment time (minute)	Phenolic combinations (mg GAE/g dry sample)	Flavonoid (mg QE/g dry sample)	% of DPPH free radical scavenging
Water	30	6.94 <sup>a</sup>	3.74 <sup>a</sup>	70.2 <sup>a</sup>
	60	5.89 <sup>b</sup>	3.24 <sup>a</sup>	62.46 <sup>b</sup>
	90	3.04 <sup>c</sup>	2.11 <sup>a</sup>	52.07 <sup>c</sup>
Ethanol 70%	30	5.98 <sup>c</sup>	3.84 <sup>c</sup>	59.11 <sup>c</sup>
	60	7.47 <sup>b</sup>	5.28 <sup>b</sup>	71.28 <sup>b</sup>
	90	8.18 <sup>a</sup>	6.15 <sup>a</sup>	87.53 <sup>a</sup>
Methanol 80%	30	3.14 <sup>c</sup>	2.87 <sup>b</sup>	50.75 <sup>c</sup>
	60	5.35 <sup>b</sup>	3.33 <sup>a</sup>	61.64 <sup>b</sup>
	90	6.27 <sup>a</sup>	3.94 <sup>a</sup>	68.15 <sup>a</sup>

Dissimilar Characters represents significant difference in 5% chance level.

بطور قابل توجهی بر استخراج ترکیبات پلی‌فنول تأثیر نمی‌گذارد [۴۰]، که با مطالعه فوق‌الذکر [۳۹] و پژوهش حاضر همخوانی ندارد. در مطالعه وُروکاوا و همکاران (۲۰۱۵) که از حلال اتانول با سه غلظت مختلف (۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد)، زمان (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) و دمای (۵۰، ۸۰ و ۱۱۰) درجه سانتی‌گراد) برای استخراج عصاره از پوست خشک دارچین استفاده کردند بهترین شرایط بهینه را حلال ۶۰ درصد اتانول، دمای استخراج ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۹۰ برای استخراج

دورلینگ و همکاران (۲۰۰۷) از ۱ تا ۳ ساعت در شیکر حمام آب استخراج عصاره را انجام دادند، آنها مشاهده کردند که محتوای کل پلی‌فنول‌ها در مدت زمان کوتاه‌تر استخراج، افزایش می‌یابد. افزایش زمان استخراج بطور بالقوه کاهش افت حلال را در اثر تبخیر افزایش می‌دهد، بنابراین پیشنهاد کردند که زمان استخراج بیش از ۳ ساعت استفاده نشود [۳۹]. اما دنت و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود مبنی بر ارزیابی قطبیت حلال و زمان استخراج بیان کردند که زمان استخراج



آمده توسط استون ۵۰ درصد و اتانول ۵۰ درصد در مقایسه با حلال‌های خالص آنها، می‌تواند به وجود آب نسبت داده شود، که ممکن است قطبیت حلال را افزایش داده باشد [۴۴]. در همین راستا نتایج ذکر شده توسط شلماشی و الیاسی (۲۰۰۸) است، که دریافتند حلالیت ویتامین C به ترتیب آب، متانول، اتانول، استون، استونیتریل و استات اتیل کاهش می‌یابد [۴۵]. نتایج دو مطالعه فوق‌الذکر با نتایج پژوهش حاصل همخوانی دارد، از این رو می‌توان دلیل بالا بودن میزان آسکوربیک اسید در عصاره آبی پوست لیمو ترش را به قطبیت بالای آب و به دنبال آن متانول بیان کرد.

#### ۴- نتیجه‌گیری کلی

فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به میزان قابل توجهی تحت تأثیر ماهیت حلال و زمان استخراج می‌باشند. با این حال، قدرت استخراج حلال، مهم‌ترین فاکتور مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول است. امواج فراصوت منجر به ایجاد نوسانات مکانیکی در یک مایع می‌گردند. تأثیر مکانیکی فراصوت باعث نفوذ حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌دهد. نتایج این تحقیق نشان داد که استخراج به کمک حلال‌های مختلف در حمام فراصوت، تأثیر متفاوتی در میزان استخراج ترکیبات زیست فعال پوست میوه لیمو ترش داشت. بطوری‌که، قوی‌ترین و ضعیف‌ترین حلال برای استخراج ترکیبات زیست فعال به ترتیب، اتانول ۷۰ درصد و آب بود که ۸/۲۰۲ و ۶/۹۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک ترکیبات فنولی، ۴/۶۱ و ۳/۷۴ میلی‌گرم معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک ترکیبات فلاونوئیدی و ۸۷/۴۶۸ و ۷۰/۲۱۳ درصد قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان داد. در حلال اتانول ۷۰ درصد اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه برای استخراج ترکیبات مؤثره مشاهده شد و زمان‌های ۹۰ و ۳۰ دقیقه به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان استخراج ترکیبات یاد شده را داشت. بنابراین در تمامی روش‌های استخراج حلال اتانول ۷۰ درصد و زمان استخراج ۹۰ دقیقه بهترین شرایط برای استخراج ترکیبات مورد نظر بود.

#### ۵- منابع

[1] Gouvea FdS, Rosenthal A, Ferreira EHdR. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. *Ciência Rural*. 2017;47-80.

ترکیبات فنولی گزارش کردند، آنها اظهار کردند که این شرایط بهینه راندمان استخراج ترکیبات مؤثره و افزایش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را فراهم می‌کند [۴۱].

### ۳-۴- محتوای اسید آسکوربیک موجود در عصاره استخراج شده از عصاره پوست لیمو ترش توسط حمام فراصوت

نتایج ارائه شده در جدول (۴) نشان داد اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌ها از نظر مقدار اسید آسکوربیک وجود دارد ( $p < 0.05$ ) و بطور کلی بیش‌ترین میزان استخراج اسید آسکوربیک در عصاره استخراج شده با کمک حلال آب (۵۱/۵۳) و کم‌ترین میزان با عصاره اتانول ۷۰ درصد (۳۲/۳۵) مشاهده گردید.

**Table 4** Vitamin C content of lemon peel extracts extracted by different solvents in ultrasound bath method

Vitamin C (mg/100g sample)	Treatment (solvent)
51.53 <sup>a</sup>	water
32.35 <sup>c</sup>	Ethanol 70%
44.48 <sup>b</sup>	Methanol 80%

Dissimilar Characters represents significant difference in 5% chance level.

مصرف میوه و سبزیجات مفید است و اثرات سلامتی میوه‌ها تا حدی به اسید آسکوربیک، که یک آنتی‌اکسیدان طبیعی است، نسبت داده می‌شود که ممکن است از پیشرفت بیماری‌های مختلفی از جمله بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان جلوگیری کند (۴۲). در مطالعه کومار و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر اندازه‌گیری ویتامین C در میوه و سبزیجات مختلف (لیمو، موز، انار، هویج، کلم، گل‌کلم و سیب‌زمینی) دریافتند که لیمو بیش‌ترین میزان ویتامین C را دارا می‌باشد (۴۳). در مطالعه پاپوتسیس و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی اثر حلال‌های مختلف (۷ حلال؛ آب، متانول خالص، اتانول، استون، متانول ۵۰ درصد، اتانول ۵۰ درصد و استون ۵۰ درصد) بر محتوای اسید آسکوربیک موجود در عصاره لیمو استخراج شده توسط حمام فراصوت اختلاف معنی‌داری مشاهده کردند، بطوری‌که عصاره آب بیش‌ترین میزان ویتامین C ( $\text{mg AAE/g dw}$ ) (۲۰۹) و به دنبال آن متانول خالص و استون ۵۰ درصد (به ترتیب  $\text{mg AAE/g dw}$  ۱۷۷ و ۱۶۵) را دارد، از آنجا که ویتامین C یک مولکول قطبی حلقوی است و با افزایش قطبیت حلال، حلالیت آن افزایش می‌یابد؛ بازه بالاتر استخراج بدست



- [15] Vilkuh K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(2):161-9.
- [16] Ghasemi S, Bashiri sadr, Z., Ghasem nezhad, A., Gasemi, M. . Study of some phenolic compounds of lemon fruit (*aurantifolia Citrus*) tissues at different stages of growth. . *Quarterly Journal of Food Science and Technology*. 2011;8(31):69-75.
- [17] Martino E, Ramaiola I, Urbano M, Bracco F, Collina S. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of chromatography A*. 2006;1125(2):147-51.
- [18] Mehni AM, Shahdadi F. Phenolic compounds and antiradical properties of methanolic extracts of *Citrullus colocynthis* and *Plantago major* in Iran. *Int J Biosci*. 2014;4(3):224-8.
- [19] Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*. 2002;10(3).
- [20] Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry*. 2007;102(4):1233-40.
- [21] Sulieman AME, Khodari KM, Salih ZA. Extraction of pectin from lemon and orange fruits peels and its utilization in jam making. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*. 2013;3(5):81-4.
- [22] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(6):1841-56.
- [23] Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco J. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food chemistry*. 2003;83(4):547-50.
- [24] Silva E, Souza J, Rogez H, Rees J-F, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food chemistry*. 2007;101(3):1012-8.
- [25] Nacz M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006;41(5):1523-42.
- [26] Ma Y-Q, Chen J-C, Liu D-H, Ye X-Q. Simultaneous extraction of phenolic
- [2] Dima C, Dima S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*. 2015;5:29-35.
- [3] Asensio CM, Grosso NR, Juliani HR. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;60(2):664-71.
- [4] Moro A, Librán CM, Berruga MI, Zalacain A, Carmona M. Mycotoxicogenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(5):1112-8.
- [5] Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*. 2007;40(1):15-21.
- [6] Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical society reviews*. 2010;39(11):4067-79.
- [7] Moon J-K, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(5):1655-66.
- [8] Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda Y, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods—Engineering and technology. *Food reviews international*. 2005;21(1):139-66.
- [9] Parker TD, Adams D, Zhou K, Harris M, Yu L. Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of food science*. 2003;68(4):1240-3.
- [10] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. 2004;94(3):223-53.
- [11] Bennici A, Tani C. Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 2004;199(6):464-75.
- [12] Szterk A, Roszko M, Sosińska E, Derewiaka D, Lewicki P. Chemical composition and oxidative stability of selected plant oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010;87(6):637-45.
- [13] Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17(6):300-12.
- [14] Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*. 2001;8(3):303-13.

- Ultrasonics Sonochemistry. 2008;15(3):227-32.
- [37] Sharifi A, Mortazavi SA, Maskooki A, Niakousari M, Elhamirad A. Optimization of subcritical water extraction of bioactive compounds from barberry fruit (*Berberis vulgaris*) by using response surface methodology. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 2013;6(2):89.
- [38] Kamali F, SADEGHI MA, NASIRIFAR Z. The Effect of Ultrasound-Assisted Conditions on the Extraction of Phenolic Compounds and Flavonoids from Autumn Olive Fruits (*Elaeagnus umbellata*). 2015.
- [39] Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, et al. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food chemistry*. 2007;101(4):1417-24.
- [40] Dent M, Dragović-Uzelac V, Penić M, Bosiljkov T, Levaj B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology*. 2013;51(1):84-91.
- [41] Dvorackova E, Snoblova M, Chromcova L, Hrdlicka P. Effects of extraction methods on the phenolic compounds contents and antioxidant capacities of cinnamon extracts. *Food science and biotechnology*. 2015;24(4):1201-7.
- [42] Sarkar N, Srivastava PK, Dubey VK. Understanding the language of vitamin C. *Current Nutrition & Food Science*. 2009;5(1):53-5.
- [43] Kumar GV, Kumar A, Raghu K, Patel G, Manjappa S. Determination of vitamin C in some fruits and vegetables in Davanagere city, (Karnataka)–India. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2013;4(3):2489-91.
- [44] Papoutsis K, Pristijono P, Golding JB, Stathopoulos CE, Scarlett CJ, Bowyer MC, et al. Impact of different solvents on the recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from lemon (*Citrus limon* L.) pomace waste. *Food science and biotechnology*. 2016; 25(4): 971-977 .
- [45] Shalmashi A, Eliassi A. Solubility of L-(+)-ascorbic acid in water, ethanol, methanol, propan-2-ol, acetone, acetonitrile, ethyl acetate, and tetrahydrofuran from (293 to 323) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2008;53(6):1332-4.
- compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*. 2009;16(1):57-62.
- [27] Dezashibi Z. Evaluation of antioxidant activity of Hana leaf extract: MS thesis. Islamic Azad University. Sabzevar Branch. 81; 2007.
- [28] Suzuki M, Watanabe T, Miura A, Harashima E, Nakagawa Y, Tsuji K. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)*. 2002.
- [29] Hassan Niya M, Aryai P, Fatahi E. The effect of extraction methods on phenolic and tocopherol content and antioxidant properties of dill extracts (*Anethum graveolens*). *Food Science and Technology*. 2016;13(57):109-19.
- [30] d’Alessandro LG, Kriaa K, Nikov I, Dimitrov K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and purification technology*. 2012;93:42-7.
- [31] Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*. 2017;7(3):47.
- [32] Katsampa P, Valsamedou E, Grigorakis S, Makris DP. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*. 2015;77:535-43.
- [33] Corbin C, Fidel T, Leclerc EA, Barakzoy E, Sagot N, Falguières A, et al. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015;26:176-85.
- [34] Falleh H, Ksouri R, Lucchessi M-E, Abdelly C, Magné C. Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. *Aizoaceae* shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2012;11(2):243-9.
- [35] Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. 2003;1012(2):119-28.
- [36] Ma Y, Ye X, Hao Y, Xu G, Xu G, Liu D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel.



## Investigation of the effect of polarity of different solvents and Times to extract the effective compounds of sour lemon peel extract by ultrasound

Latifi, Z. <sup>1\*</sup>, Alipour, M. <sup>2</sup>, Zibaei, M. <sup>3</sup>, AbdollahiChalehbari, Z. <sup>4</sup>, Ghafouri, Z. <sup>5</sup>, GhorbaniPirshahid, T. <sup>6</sup>

1. Young Researchers and Elites Researchers Club, Islamic Azad University, Sari Branch.

2. Master student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

3. Graduate of the Department of Food Science and Technology, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

4. Graduate of the Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, North Tehran, Iran.

5. PhD Student, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

6. Graduate of the Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2019/ 04/ 18

Accepted 2021/ 09/ 04

#### Keywords:

Ultrasound,  
Extraction,  
Bioactive compounds,  
Lemon peel extract.

**DOI:** 10.52547/fsct.18.120.1

**DOR:** 20.1001.1.20088787.1400.18.120.1.3

\*Corresponding Author E-Mail:  
[yasamin.latifi131@yahoo.com](mailto:yasamin.latifi131@yahoo.com)

### ABSTRACT

The ultrasound process is a non-thermal method of extraction, and due to its effective effects on food storage and processing its use is increasing. The aim of this study was to compare different solvents in the extraction efficiency of effective compounds with ultrasound from lemon zest extract, so far, not many studies have been done on sour lemon peel and more extensive research has been done on oranges and other citrus fruits, and this was the reason for this research. In this method in order to evaluate the phenol and flavonoids extraction and to assess the inhibitory power of DPPH free radicals, three different water solvents, 70% ethanol and 80% methanol were used. Then, the best solvent for the extraction of these compounds at of 30, 60 and 90 moments were compared. The software used for analysis of variance and comparison of means was SPSS. According to the results, the strongest and weakest solvent for the extraction of bioactive compounds were 70% ethanol and water, which was 8.202 and 6.95 mg, equal to Gallic acid per grams of dry extract of phenolic compounds, 4.61 and 3.74 mg equal to quercetin grams of compound flavonoids dry matter and 87.468 and 70.213 percent of the inhibitory power of DPPH-free radicals. In 70% ethanol solvent, a significant difference was observed between 30, 60 and 90 moments for extraction of effective compounds, and 90 and 30 minutes, respectively, had the highest and lowest extraction rates of the compounds, respectively. In each extraction method, the amount of extraction of bioactive compounds was different depending on the solvent and 70% ethanol solvent was the best extraction method.