



استخراج ترکیبات زیست فعال مغز دانه نارنج به کمک مایکروویو و تعیین ویژگی های پاداکسندگی آنها

محمدتقی گلمکانی<sup>۱\*</sup>، آریتا حسین زاده فربودی<sup>۲</sup>، غلامرضا مصباحی<sup>۳</sup>، سیده نصیره علوی<sup>۴</sup>

۱-دکتری، استاد تمام، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲-کارشناسی ارشد، دانش آموخته، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۳-کارشناسی ارشد، استادیار، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۴-دکتری، دانش آموخته، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	در مطالعه‌ی حاضر، ترکیبات زیست فعال از مغز دانه نارنج ( <i>Citrus aurantium</i> )، به عنوان یکی از پسماندهای فرآوری مرکبات با استفاده از روش مایکروویو استخراج شد. اثر چهار متغیر مستقل شامل توان مایکروویو (۳۰۰-۱۰۰ وات)، زمان استخراج (۱۵-۵ دقیقه)، وزن نمونه (۱۵-۵ گرم) و حجم حلال (۲۰۰-۱۰۰ میلی لیتر) بر پاسخ های بازدهی استخراج، میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل، فعالیت مهار رادیکال آزاد (IC <sub>50</sub> )، قدرت احیای یون فریک، ظرفیت احیای یون مس و ظرفیت کلاته کنندگی بررسی شد. روش سطح پاسخ مبتنی بر طرح مرکب مرکزی به منظور بررسی اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ ها و هم چنین به منظور بهینه سازی شرایط استخراج استفاده شد. شرایط بهینه استخراج شامل توان مایکروویو ۳۰۰ وات، زمان استخراج ۱۵ دقیقه، وزن نمونه ۵ گرم و حجم حلال ۲۰۰ میلی لیتر بود. در خصوص بازدهی استخراج، با افزایش توان مایکروویو، زمان استخراج و وزن نمونه، میزان آن به شکل معنی داری افزایش یافت درحالی که با افزایش حجم حلال، میزان آن به شکل معنی داری کاهش یافت. هم چنین، بیشترین میزان فنل کل عصاره در کمترین سطوح توان مایکروویو و زمان استخراج مشاهده شد. در رابطه با میزان فلاونوئید کل عصاره، با افزایش زمان استخراج و افزایش حجم حلال، میزان آن به شکل معنی داری افزایش یافت درحالی که با افزایش وزن نمونه، میزان آن به شکل معنی داری کاهش یافت. علاوه بر این، ظرفیت احیای یون مس عصاره با افزایش توان مایکروویو، زمان استخراج و حجم حلال، برخلاف وزن نمونه، به شکل معنی داری افزایش یافت. در مجموع، روش استخراج به کمک مایکروویو را می توان به عنوان روشی مناسب برای استخراج ترکیبات زیست فعال از مغز دانه نارنج پیشنهاد داد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱۸	
کلمات کلیدی: استخراج، مایکروویو، مغز دانه نارنج، پسماند مرکبات، پاداکسند	
DOI: 10.22034/FSCT.21.146.138	
* مسئول مکاتبات: golmakani@shirazu.ac.ir	

## ۱-مقدمه

پسماند مواد غذایی<sup>۱</sup> به بخشی از غذا و اجزای غیرقابل خوردن غذا که از زنجیره تامین مواد غذایی خارج شده و بازیافت یا دور ریخته می‌شوند، گفته می‌شود. در سراسر زنجیره تامین، از مزرعه گرفته تا کارخانه فرآوری و حتی تا بازار خرده‌فروشی، امکان به‌وجود آمدن پسماند مواد غذایی وجود دارد. در صنایع تبدیلی میوه‌ها و سبزیجات، اجزای باقی‌مانده مانند دانه، برگ، پوست، ساقه، تفاله و پالپ، پسماند محسوب می‌شوند. میوه‌ها و سبزیجات، ۹۳ درصد از کل پسماند غذایی ایجاد شده توسط بخش فرآوری مواد غذایی را تشکیل می‌دهند. بر اساس گزارش FAO، مقدار سالانه پسماند میوه‌ها و سبزیجات تا سال ۲۰۱۶ به ۵۰-۴۰ درصد برای سبزی‌های غده‌ای<sup>۲</sup>، میوه‌ها و حبوبات رسیده است [۱، ۲]. فرآورده‌های جانبی حاصل از فرآوری میوه‌ها و سبزیجات حاوی مقدار بالایی از ترکیبات زیست‌فعال مانند فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، فیتواسترول‌ها، توکوفرول‌ها، ساپونین‌ها و اسیدهای آلی بوده که ویژگی‌های زیستی مختلف مانند فعالیت پاداکسندگی، ضد دیابت، ضد التهاب، محافظت از قلب و عروق و فعالیت ضد سرطانی نشان می‌دهند. از آنجایی که این فرآورده‌های جانبی منبع مهمی از ترکیبات زیست‌فعال هستند، با افزودن ترکیبات زیست‌فعال به مواد غذایی می‌توان ارزش تغذیه‌ای و پایداری اکسیداسیون را افزایش داده و هم‌چنین از آن‌ها در غذاهای فراسودمند نوین استفاده کرد [۳-۵]. با استفاده از روش‌های مختلف استخراج می‌توان ترکیبات زیست‌فعال را از پسماندهای کشاورزی و صنعتی استخراج کرد [۵].

صنعت مرکبات سهم قابل توجهی در تولید پسماند مواد غذایی دارد [۶]. فرآوری مرکبات سالانه تقریباً ۱۰ میلیون تن پسماند تولید می‌کند [۷]. حدود یک سوم مرکبات برای فرآوری آب‌میوه استفاده می‌شود که حین این فرآیند تولید، مقادیر قابل توجهی پسماندهای غیر قابل

استفاده<sup>۳</sup> ایجاد می‌شوند [۶]. در سال ۲۰۲۰، تولید کلی مرکبات در جهان حدود ۱۵۸/۴۹ میلیون تن بوده است. در میان مرکبات، پرتقال‌های تلخ (*Citrus aurantium*) و شیرین (*Citrus sinensis*) با تولید کل حدود ۷۵/۴۱ میلیون تن از محبوب‌ترین مرکبات در سراسر جهان هستند [۲، ۷، ۸]. طبق استاندارد ایران به شماره ۱۷۷ (تیرماه ۱۳۸۰)، نارنج یا همان پرتقال تلخ با نام علمی *Citrus aurantium* L. از خانواده مرکبات (Rutaceae) می‌باشد [۹]. طبق آخرین آمار ارائه شده توسط FAOSTAT در سال ۲۰۲۱، میزان تولید Oranges در ایران ۲/۱۴ میلیون تن بوده است [۲]. پس از استخراج آب مرکبات، مواد جامد باقی‌مانده به‌عنوان فرآورده‌های جانبی مرکبات در نظر گرفته می‌شوند. با اینکه فرآورده‌های جانبی مرکبات را پسماند مرکبات می‌نامند، اما حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیبات ارزشمند مانند فیبر، پروتئین، پکتین، پلی‌فنل‌ها و اسانس‌ها هستند. با فرآوری پسماند مرکبات می‌توان محصولاتی با ارزش بیشتر تولید کرد [۱۰]. پسماند مرکبات معمولاً از ۶۵ درصد پوست (فلاودو و آلبدو) و حدود ۳۵-۳۰ درصد پالپ (باقی‌مانده-های کیسه آب‌میوه) و دانه تشکیل می‌شوند. دانه‌های مرکبات، منبع پاداکسنده‌های طبیعی بوده که می‌توانند برای مصارف مختلف در مواد غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار بگیرند. دانه‌های مرکبات حاوی کربوهیدرات (۶۹ درصد)، رطوبت (۶ درصد)، پروتئین خام (۶ درصد)، فیبر خام (۵ درصد)، لیپید (۱۲ درصد) و خاکستر (۲ درصد) می‌باشند [۶، ۷، ۱۱]. پیش‌بینی می‌شود که بازار جهانی ترکیبات زیست‌فعال تا سال ۲۰۲۶ به ۹۶/۱ میلیارد دلار برسد که ناشی از افزایش تقاضای مصرف کنندگان می‌باشد. به‌دلیل تقاضای فزاینده پاداکسنده‌های طبیعی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی، بازار آن‌ها ۴/۱۴ میلیارد دلار پیش‌بینی شده است. از این‌رو، استخراج ترکیبات زیست‌فعال با ارزش افزوده بالا، به یک راهبرد

جذاب برای مدیریت و ارزش گذاری فرآورده های جانبی مرکبات تبدیل شده است [۶].

استخراج مرحله اصلی بازیابی ترکیبات با ارزش افزوده از پسماند و فرآورده های جانبی مرکبات می باشد. استفاده از فناوری های نوین مانند استخراج به کمک مایکروویو برای بهینه سازی استخراج ترکیبات زیست فعال با ارزش افزوده از فرآورده های جانبی مواد غذایی مورد استفاده و بررسی قرار گرفته است [۱۰، ۱۲]. روش استخراج به کمک مایکروویو مزایای متعددی نسبت به روش های مرسوم استخراج دارد. استفاده از تشعشعات غیر یونیزه کننده با فرکانس بالا در این روش منجر به شرایط دمایی و فشاری بسیار موضعی شده که به فرآیند استخراج کمک می کند. مایکروویوها هم میدان الکتریکی و هم میدان مغناطیسی دارند. میدان الکتریکی از طریق چرخش دو قطبی<sup>۱</sup> و هدایت یونی<sup>۲</sup>، گرما ایجاد می کند. برخلاف روش های متداول، در استخراج به کمک مایکروویو، کل نمونه به شکل هم زمان گرم می شود. گرما پیوندهای هیدروژنی ضعیف را به دلیل چرخش دوقطبی مولکول ها شکسته و مهاجرت یون های محلول باعث افزایش نفوذ حلال در نمونه می شود. سه مرحله متوالی در مکانیسم استخراج به کمک مایکروویو شرح داده شده است: ۱- جداسازی حرارتی و فشاری حل شونده ها از ماتریس نمونه، ۲- انتشار حلال در ماتریس نمونه، و ۳- رهایش حل شونده ها به واسطه حلال از ماتریس نمونه. در نتیجه، حرارت دهی با مایکروویو منجر به حرارت دهی سریع با راندمان بالا می شود [۴، ۵، ۱۳، ۱۴].

هم چنین این نکته قابل ذکر است که استخراج به کمک مایکروویو معمولاً به دو شکل انجام می شود: ۱- استخراج به کمک مایکروویو با استفاده از حلال<sup>۳</sup> و ۲- استخراج به کمک مایکروویو بدون استفاده از حلال<sup>۴</sup>. در روش اول، نمونه با حلال هایی مانند اتانول، متانول، آب و غیره مخلوط شده و در معرض امواج مایکروویو قرار می گیرد [۱۵].

کیفیت و کمیت ترکیبات استخراج شده به کمک مایکروویو تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله زمان و توان استخراج و نسبت حلال به نمونه می باشد. انتخاب کنترل شده شاخص های استخراج می تواند شرایط دستیابی به میزان بیشتری از ترکیبات فنلی را فراهم کند [۱۶].

استخراج ترکیبات زیست فعال به کمک مایکروویو و بررسی ویژگی های پاداکسندگی از پسماند پوست آناناس [۱۷]، پالپ جامون سیاه [۱۸]، پوست انار [۱۹]، پسماند فرآوری شاه بلوط [۲۰]، پوست انگور [۲۱]، پوست آلبالو [۲۲]، پسماند جامد گل کلم، کرفس، کاسنی و مارچوبه [۲۳]، پسماند لیمو [۲۴] و پوست ماندارین [۲۵] انجام شده است. در مطالعه استخراج به کمک مایکروویو از پوست آناناس مشخص شد که مایکروویو می تواند به خوبی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی همراه با توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH را از پسماند پوست آناناس استخراج کند. در این پژوهش نتیجه گیری شد که روش مایکروویو، روشی مطلوب برای استخراج ترکیبات زیست فعال با بازدهی بالاتر بود [۱۷]. هم چنین، در مطالعه استخراج ترکیبات زیست فعال از پالپ جامون سیاه، مایکروویو به عنوان روشی کارآمد برای استخراج ترکیبات فنلی و آنتوسیانین بود. در این مطالعه نتیجه گیری شد که فرآیند استخراج به کمک مایکروویو را می توان از مقیاس آزمایشگاهی<sup>۵</sup> به مقیاس نیمه صنعتی<sup>۶</sup> ارتقاء داد [۱۸].

با استفاده از روش سطح پاسخ می توان متغیرهای موثر بر فرآیند استخراج به کمک مایکروویو و تنظیمات استخراج بهینه را از طریق طرح آزمایش<sup>۷</sup> تعیین کرد [۱۳]. هدف از این مطالعه، بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات زیست فعال از مغز دانه نارنج (به عنوان پسماند فرآوری نارنج) با روش مایکروویو با استفاده از حلال می باشد. میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل و فعالیت پاداکسندگی عصاره های استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت.

5 -Laboratory scale  
6 -Pilot scale  
7 -Experimental design

1 -Dipole rotation  
2 -Ionic conduction  
3 -Microwave-assisted solvent extraction  
4 -Microwave-assisted solvent-free extraction

اندازه‌گیری شد [۲۶]. مغز دانه نارنج شامل ۱۰/۷۲ درصد رطوبت، ۲۱/۰۰ درصد چربی، ۲/۶۵ درصد پروتئین، ۲/۵۵ درصد خاکستر و ۶۳/۰۸ درصد کربوهیدرات بود.

## ۲-۳- استخراج عصاره مغز دانه نارنج به کمک مایکروویو

طرح کلی پژوهش حاضر در شکل ۱ نشان داده شده است. استخراج عصاره با استفاده از یک دستگاه مایکروویو خانگی تغییر یافته<sup>۱</sup> - نصب کردن کندانسور در قسمت بالای مایکروویو- (فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز، ME3410W، سامسونگ، مالزی) انجام شد. مغز دانه نارنج با استفاده از متانول به‌عنوان حلال و با در نظر گرفتن ۴ متغیر مستقل شامل توان مایکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال (هر یک در ۳ سطح) بر اساس یک طرح آزمایش (ارائه شده در جدول ۱) استخراج شد. پس از استخراج، عصاره‌ها فیلتر شده و در ظروف تیره‌رنگ در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون‌ها نگهداری شدند. بازدهی استخراج، میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل، آزمون‌های تعیین فعالیت پاداکسندگی و ویژگی‌های فیزیکی (به‌عنوان پاسخ‌های طرح آزمایش) برای عصاره‌ها ارزیابی شدند. اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های مختلف با استفاده از روش سطح پاسخ برپایه طرح مرکب مرکزی<sup>۲</sup> بررسی شد. ماتریس طرح آزمایش با ۳۰ رانش<sup>۳</sup> در جدول ۱ گزارش شده است.

اعتبارسنجی شرایط بهینه پیش‌بینی شده حاصل از نرم افزار با آزمون تجربی انجام شده در این شرایط ارزیابی شد. هم-چنین، میزان ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت پاداکسندگی عصاره استخراج شده به کمک مایکروویو در شرایط بهینه با ویژگی‌های عصاره استخراج شده به کمک الکتروموتل (روش مرسوم) مقایسه گردید.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد شیمیایی و معرف‌ها

متانول، معرف فولین-سیوکالتیو، سدیم کربنات، اسید گالیک، آلومینیوم کلرید، پتاسیم استات، کوئرستین، پتاسیم فری سیانید، نمک‌های فسفات، کلرید آهن، تری‌کلرواستیک اسید، اسید آسکوربیک، معرف دی فنیل پیکریل هیدرازیل DPPH، کلرید مس، آمونیوم استات، معرف نئوکوپرین، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید EDTA و معرف فروزین از شرکت‌های سیگما-آلدریج (St. Louis, MO) و مرک آلمان خریداری شدند.

### ۲-۲- مغز دانه نارنج

دانه‌های نارنج به‌عنوان پسماند از کارخانه لیمون‌دیس (شهرک صنعتی تل بیضاء، شهر بیضاء، استان فارس) تهیه شد. سپس مغز دانه‌ها از پوسته به‌شکل دستی جدا گردید. ترکیب شیمیایی تشکیل‌دهنده مغز دانه نارنج طبق روش-های استاندارد انجمن متخصصین شیمی غلات آمریکا

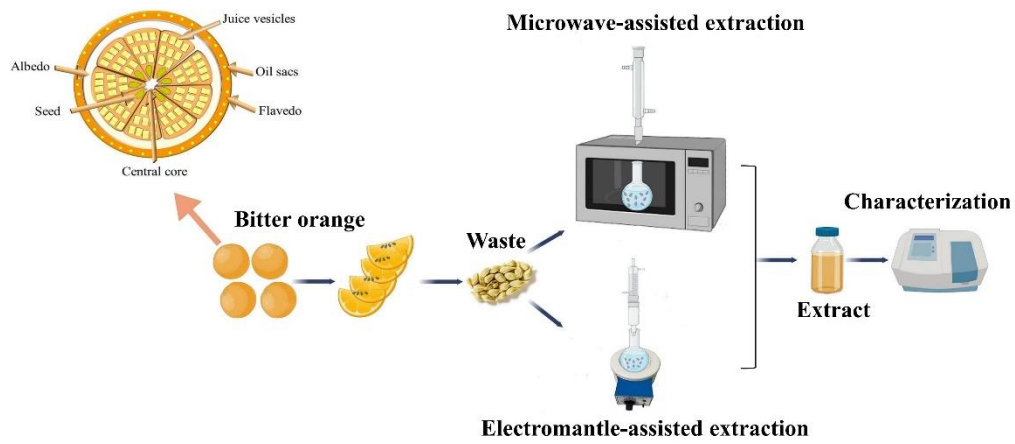


Fig. 1. Schematic of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from bitter orange seed cotyledon and in comparison with electromantle-assisted extraction method.

Table 1. Experimental design matrix of response surface methodology based on the central composite design as well as physical properties of extracts of bitter orange seed cotyledon, extracted using a microwave.

Run	Microwave Power (W; A)	Extraction time (min; B)	Sample weight (g; C)	Solvent volume (mL; D)	Refractive index	pH	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Color parameters		
								L*	a*	b*
1	100	5	5	100	1.3333	7.74	0.800	66.00	-2.00	6.00
2	100	5	5	200	1.3312	7.79	0.802	68.00	0.00	4.00
3	100	5	15	100	1.3356	7.61	0.750	65.00	0.00	8.00
4	100	5	15	200	1.3333	7.78	0.788	59.00	0.00	4.00
5	100	10	10	150	1.3320	7.70	0.750	66.00	-3.00	8.00
6	100	15	5	100	1.3344	7.75	0.810	53.00	-4.00	12.00
7	100	15	5	200	1.3315	7.72	0.782	62.00	-3.00	9.00
8	100	15	15	100	1.3355	7.65	0.750	60.00	-3.00	11.00
9	100	15	15	200	1.3332	7.74	0.773	64.00	-3.00	9.00
10	200	5	10	150	1.3310	7.67	0.820	67.00	-2.00	6.00
11	200	10	5	150	1.3334	7.78	0.819	65.00	-2.00	5.00
12	200	10	10	100	1.3349	7.69	0.825	66.00	-2.00	9.00
13	200	10	10	150	1.3331	7.69	0.790	66.00	-4.00	10.00
14	200	10	10	150	1.3304	7.73	0.792	69.00	-3.00	8.00
15	200	10	10	150	1.3306	7.66	0.786	66.00	-3.00	8.00
16	200	10	10	150	1.3333	7.75	0.790	69.00	-3.00	9.00
17	200	10	10	150	1.3328	7.78	0.787	70.00	-4.00	10.00
18	200	10	10	150	1.3307	7.68	0.786	69.00	-4.00	10.00
19	200	10	10	200	1.3317	7.75	0.806	73.00	-3.00	7.00
20	200	10	15	150	1.3330	7.73	0.810	69.00	-3.00	8.00
21	200	15	10	150	1.3308	7.71	0.799	67.00	-3.00	10.00
22	300	5	5	100	1.3308	7.80	0.784	73.00	-3.00	8.00
23	300	5	5	200	1.3299	7.81	0.748	71.00	0.00	5.00
24	300	5	15	100	1.3319	7.72	0.740	72.00	-2.00	8.00
25	300	5	15	200	1.3307	7.82	0.751	69.00	-3.00	8.00
26	300	10	10	150	1.3306	7.82	0.708	72.00	-3.00	8.00
27	300	15	5	100	1.3307	7.81	0.770	73.00	-2.00	7.00
28	300	15	5	200	1.3400	7.79	0.890	64.00	0.00	4.00
29	300	15	15	100	1.3317	7.68	0.729	64.00	-4.00	12.00
30	300	15	15	200	1.3329	7.75	0.713	63.00	-3.00	10.00

## ۲-۴- بازدهی استخراج

صورت  $IC_{50}$  یعنی غلظت لازم برای مهار ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH تعیین و بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد.

برای تعیین بازدهی استخراج عصاره‌ها، ابتدا حلال از طریق تغلیظ کننده چرخان تحت خلا (Buchl, T63AL, Company, سوئیس) تبخیر و جداسازی گردید. سپس، میزان بازدهی استخراج ترکیبات از مغز دانه نارنج از طریق تقسیم وزن عصاره خشک شده بر حجم عصاره محاسبه و بر حسب درصد ارائه شد.

۲-۷-۲- قدرت احیای یون فریک<sup>۱۴</sup>

قدرت احیای یون فریک عصاره‌ها بر اساس روش Rekha و همکاران [۲۸] اندازه‌گیری شد. قدرت احیای یون فریک بر حسب میلی گرم اسید آسکوربیک بر گرم نمونه گزارش شد.

## ۲-۵- میزان فنل کل

میزان فنل کل عصاره‌ها با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو و بر اساس روش Habibi و همکاران [۲۷] اندازه‌گیری شد. نتایج میزان فنل کل بر حسب میکروگرم معادل اسید گالیک (GAE) بر گرم نمونه گزارش شد.

۲-۷-۳- ظرفیت احیای یون مس<sup>۱۵</sup>

ظرفیت احیای یون مس (کوپراک) عصاره‌ها طبق روش Pascu و همکاران [۲۹] و با استفاده از معرف نئوکوپرین مورد بررسی قرار گرفت. ظرفیت احیای یون مس بر حسب میلی گرم اسید آسکوربیک بر گرم نمونه گزارش شد.

## ۲-۶- میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها از طریق روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید و طبق روش Habibi و همکاران [۲۷] محاسبه شد. میزان فلاونوئید کل عصاره‌های به دست آمده در شرایط مختلف استخراج بر حسب میکروگرم معادل کوئرستین (QE) بر گرم نمونه گزارش شد.

## ۲-۷-۴- ظرفیت کلاته‌کنندگی

ظرفیت کلاته‌کنندگی یون فروس توسط عصاره‌ها در حضور معرف فروزین بر اساس روش Oyetayo و همکاران [۳۰] اندازه‌گیری شد. ظرفیت کلاته‌کنندگی بر حسب میلی گرم EDTA بر گرم نمونه گزارش شد.

## ۲-۷-۷- ویژگی‌های پاداکسندگی

## ۲-۷-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

میزان pH عصاره‌های استخراج شده توسط دستگاه pH متر (Starter 3000, Ohaus, نیوجرسی) اندازه‌گیری شد. ضریب شکست عصاره‌ها با استفاده از نمار سنج (رفراکتومتر) آبه (Carl Zeiss, Abbe, آلمان) در دمای ۱۸ درجه سلسیوس تعیین گردید. دانسیته عصاره‌ها از طریق توزین ۱۰۰۰

فعالیت پاداکسندگی از طریق توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش Habibi و همکاران [۲۷] اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمون از نسبت ۱:۳ نمونه (در غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۱/۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به محلول DPPH استفاده شد. سپس، فعالیت پاداکسندگی به-

Cupric ion reducing antioxidant capacity; CUPRAC<sup>۱۵</sup>FRAP Ferric ion reducing antioxidant power;<sup>۱۴</sup>

احیای یون مس، ظرفیت کلاته‌کنندگی و ویژگی‌های فیزیکی ارزیابی شد. روش سطح پاسخ برپایه طرح مرکب مرکزی برای ارزیابی اثر متغیرهای مستقل به صورت تکی و متقابل بر پاسخ‌ها و همچنین بهینه‌سازی شرایط استخراج استفاده شد. از آنالیز واریانس برای بررسی معنی‌داری استفاده شد. سطح احتمال  $P < 0.01$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. ماتریس طرح آزمایش، تحلیل داده‌ها و اثر متغیرهای مستقل با استفاده از نرم افزار Design Expert (نسخه ۱۰، State-Ease Inc. مینیاپولیس) طراحی و ارزیابی شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- طرح آزمایش

در طرح آزمایش، از روش سطح پاسخ مبتنی بر طرح مرکب مرکزی برای بررسی اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. جدول ۲، نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ را نشان می‌دهد. مقادیر ضریب تعیین ( $R^2$ )، ضریب تعیین تنظیم شده ( $Adjusted R^2$ ) و ضریب تعیین پیش‌بینی شده ( $Predicted R^2$ ) به ترتیب  $< 0.97$ ،  $< 0.94$  و  $< 0.85$  بودند. نزدیک بودن ضریب تعیین مدل‌ها با مقادیر پیش‌بینی شده نشان‌دهنده هم‌بستگی قوی بین داده‌های پیش‌بینی شده و تجربی می‌باشد. هم‌چنین، باید مقادیر ضریب تعیین تنظیم شده با پیش‌بینی شده قابل مقایسه باشد تا بتواند یک مدل خوب را نشان دهد. در این خصوص، ضریب تعیین پیش‌بینی شده مدل‌ها با ضریب تعیین تنظیم شده، مطابقت قابل قبولی داشتند (تفاوت کمتر از  $0.2$ )، هم‌چنین، دقت کافی ( $Adequate Precision$ ) نسبت سیگنال به نویز را نشان می‌دهد که برای اعداد بزرگتر از ۴، مطلوب است. این نسبت برای تمام مدل‌های پاسخ‌ها بالاتر از ۴ بود که نشان‌دهنده سیگنال کافی بوده که در نتیجه مدل مطلوب می‌باشد. پایین بودن ضریب تغییرات ( $Coefficient of variation$ )، بالا بودن دقت و قابلیت اطمینان<sup>۱۷</sup> مقادیر تجربی را نشان می‌دهد [۳۱]. عدم برازش<sup>۱۸</sup> برای بازدهی استخراج، میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل، مهار رادیکال آزاد و ظرفیت کلاته‌کنندگی غیر معنی‌دار بودند.

میکرولیتر از نمونه در دمای ۱۸ درجه سلسیوس تعیین و بر حسب گرم بر سانتی‌متر مکعب بیان شد. رنگ عصاره‌ها با اندازه‌گیری شاخص‌های  $L^*$ ،  $a^*$ ،  $b^*$  که به ترتیب نشان‌دهنده روشنایی، قرمزی-سبزی و زردی-آبی هستند، با استفاده از نرم افزار ادوبی فتوشاپ (نسخه 8.0، Adobe system، کالیفرنیا) تعیین گردید.

#### ۲-۹- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی روش استخراج به کمک مایکروویو

شرایط بهینه استخراج عصاره از مغز دانه نارنج به کمک مایکروویو بر اساس حداکثر میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل، قدرت احیای یون فریک، ظرفیت احیای یون مس و ظرفیت کلاته‌کنندگی و هم‌چنین حداقل میزان  $IC_{50}$  با استفاده از نرم افزار پیش‌بینی شد. سپس، برای تایید<sup>۱۶</sup> اعتبار مدل‌ها، در سطوح متغیرهای مستقل پیش‌بینی شده، عصاره مغز دانه نارنج به کمک مایکروویو استخراج شد (آزمون تجربی) و ویژگی‌های عصاره حاصل، نیز ارزیابی گردید. مقادیر پاسخ‌های پیش‌بینی شده با آزمون تجربی مقایسه شدند.

#### ۲-۱۰- مقایسه روش استخراج به کمک مایکروویو با روش الکتروموتل

در شرایط بهینه پیش‌بینی و انتخاب شده توسط نرم افزار با روش سطح پاسخ، عصاره مغز دانه نارنج به کمک روش الکتروموتل (به عنوان یک روش متداول) نیز استخراج شد. سپس، ویژگی‌های عصاره استخراج شده به کمک روش الکتروموتل با عصاره استخراج شده به کمک روش مایکروویو مقایسه گردید.

#### ۲-۱۱- طرح آزمایش و آکاوای آماری

ماتریس طرح آزمایش با ۳۰ رانش در جدول ۱ گزارش شده است. اثر چهار متغیر مستقل شامل توان مایکروویو (A)، زمان استخراج (B)، وزن نمونه (C) و حجم حلال (D) بر پاسخ‌های مختلف شامل بازدهی استخراج، میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل،  $IC_{50}$ ، قدرت احیای یون فریک، ظرفیت



Table 2. Analysis of variance of quadratic models applied for different responses of extracts of bitter orange seed cotyledon, extracted using a microwave.

Property (response)	Model		R <sup>2</sup> (coefficient of determination)	Adjusted R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>	Coefficient of variation (%)	Adequate precision
	P	F-value					
Extraction yield (%)	<0.0001	178.94	0.9940	0.9885	0.9949	3.38	58.44
TPC <sup>1</sup> (µg GAE/g)	<0.0001	82.51	0.9872	0.9752	0.9082	9.04	39.78
TFC <sup>2</sup> (µg QE/g)	<0.0001	38.79	0.9731	0.9480	0.9101	10.55	29.59
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	<0.0001	117.28	0.9909	0.9825	0.9585	5.31	53.73
FRAP <sup>3</sup> (mg ascorbic acid/g)	<0.0001	807.82	0.9987	0.9974	0.9809	8.01	151.90
CUPRAC <sup>4</sup> (mg ascorbic acid/g)	<0.0001	51.69	0.9797	0.9607	0.8562	7.51	29.67
Chelating capacity (mg EDTA/g)	<0.0001	63.92	0.9835	0.9681	0.9355	7.64	37.81

<sup>1</sup>Total phenolic content; <sup>2</sup>Total flavonoid content; <sup>3</sup>Ferric ion reducing antioxidant power; <sup>4</sup>Cupric ion reducing antioxidant capacity.

### ۳-۲- بازدهی استخراج

در شکل‌های ۲ (a-b)، اثر توان میکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال بر بازدهی استخراج نشان داده شده است. تمام متغیرها اثر معنی‌داری بر بازدهی عصاره‌ها نشان دادند. با افزایش توان میکروویو از ۱۰۰ به ۳۰۰ وات، میزان بازدهی استخراج افزایش یافت. افزایش زمان استخراج (از ۵ به ۱۵ دقیقه) منجر به افزایش بازدهی استخراج شد. با افزایش وزن نمونه از ۵ به ۱۵ گرم میزان بازدهی استخراج افزایش یافت. با این حال، با افزایش حجم حلال، بازدهی استخراج کاهش یافت. حداکثر و حداقل میزان بازدهی استخراج به ترتیب ۱/۳۷۷ درصد و ۰/۳۷۳ درصد بود. مشاهده گردید که افزایش توان میکروویو موجب افزایش بازدهی استخراج می‌شود. امواج میکروویو باعث گرم شدن حجمی مواد می‌شوند. چرخش دوقطبی در میدان الکتریکی باعث شکستن پیوندهای هیدروژنی شده و هم‌چنین مهاجرت یون‌ها در میدان الکتریکی باعث نفوذ بهتر حلال در نمونه و در نتیجه حل شدن بهتر اجزای قابل استخراج و در نهایت استخراج بهتر اجزا می‌شود [۱۵]. به عبارتی، با افزایش دما حین فرآیند استخراج، کشش سطحی و ویسکوزیته حلال کاهش و در نتیجه نفوذ حلال به ماتریس

نمونه بهبود می‌یابد [۱۳]. در این زمینه، Prakash Maran و همکاران مشاهده کردند که با افزایش توان میکروویو از ۱۶۰ به ۴۸۰ وات، میزان بازدهی استخراج پکتین از پوسته بیرونی هندوانه (*Citrullus lanatus*) افزایش یافت. آن‌ها بیان کردند که افزایش انرژی میکروویو می‌تواند نفوذ حلال به درون ماتریس گیاهی را افزایش داده و با انتقال سریع انرژی به حلال و ماتریس، امکان حل شدن اجزا را فراهم آورد [۳۲]. از آنجایی که استخراج یک فرآیند انتقال جرم می‌باشد، انتظار می‌رود زمان استخراج تا به تعادل رسیدن بازدهی ادامه داشته باشد [۲۰]. در طول فرآیند استخراج به کمک میکروویو، حل شونده‌ها با حلال در تماس هستند. بنابراین، افزایش زمان استخراج می‌تواند انتقال جرم ترکیبات فعال را افزایش داده [۳۳] و حلالیت ترکیبات و انتشار آن‌ها از سلول به حلال را افزایش دهد [۳۴]. با این حال، ذکر این نکته قابل توجه است که اگرچه با افزایش زمان استخراج بازدهی استخراج افزایش می‌یابد، اما امکان تخریب ترکیبات زیست-فعال نیز وجود دارد [۲۴].

همان‌طور که اشاره شد، در حجم‌های کمتر حلال، بازدهی بیشتر می‌باشد. علت این امر به این دلیل است که این حجم از حلال برای انتقال جرم ترکیبات کافی می‌باشد. هم‌چنین،

بالا بودن میزان فنل کل می‌تواند با توانایی پاداکسندگی بالا همراه باشد. از این‌رو، این سنجش شاخص مهمی برای تعیین ظرفیت پاداکسندگی کل است. پلی‌فنل‌های گیاهی از این نظر چند عملکردی بوده و می‌توانند به‌عنوان عوامل احیاکننده، اهدا کننده اتم هیدروژن و حذف‌کننده‌های اکسیژن یگانه عمل کرده و برخی از آن‌ها قادر به کلاته کردن یون‌های فلزی واسطه می‌باشند [۳۶].

ترکیبات فنلی شناسایی شده در دانه نارنج، اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک، اسیدهای هیدروکسی سینامیک، فلاوانون‌ها، فلاوانول‌ها، فلاونول‌ها، فلاون‌ها، فنل‌های ساده و کومارین بوده‌اند. در این راستا، اسید رزمارینیک، اسید گالیک و اسید پارا-کوماریک به‌عنوان بیشترین ترکیبات اسیدهای فنلیک در دانه نارنج شناسایی شده‌اند [۳۷]. اثر توان میکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال بر میزان فنل کل عصاره‌ها در شکل‌های ۲ (c-d) نشان داده شده است. متغیرهای زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال اثر معنی‌داری بر میزان فنل کل عصاره‌ها داشتند. در کمترین سطح توان میکروویو، بیشترین میزان فنل کل مشاهده شد. بیشترین میزان فنل کل مربوط به کمترین زمان استخراج بود. افزایش وزن نمونه منجر به کاهش میزان فنل کل شد. با افزایش حجم حلال تا ۱۵۰ میلی‌لیتر میزان فنل کل افزایش و سپس با افزایش بیشتر در حجم حلال، میزان فنل کل کاهش یافت. حداکثر و حداقل میزان فنل کل به ترتیب ۷۰۸۲۶/۰۰ و ۱۷۱۳/۳۸ میکروگرم معادل اسید گالیک بر گرم بود. حداکثر میزان فنل کل در توان کم میکروویو اعمال شده طی زمان کم استخراج به‌دست آمد. در توان و زمان کمتر میکروویو، آسیب حرارتی وارد شده به ترکیبات زیست‌فعال کمتر می‌باشد. در این راستا، Hayat و همکاران گزارش کردند که طی فرآیند میکروویو، میزان اسیدهای فنلیک (به صورت آزاد و متصل) پوست ماندارین به‌شکل معنی‌داری تحت تاثیر زمان استخراج قرار دارد. مجموع اسیدهای فنلیک آزاد با افزایش زمان استخراج از ۵ به ۱۵ دقیقه، برخلاف میزان اسیدهای فنلیک به‌صورت متصل (متصل به استر و گلیکوزید)، افزایش یافت. آن‌ها توضیح دادند که به‌دلیل

جذب انرژی بیشتر توسط حلال به‌دلیل حجم بالاتر، جذب انرژی میکروویو نمونه را کاهش می‌دهد [۳۵]. با این حال، حین استخراج باید این نکته مدنظر قرار گیرد که حجم حلال برای غوطه‌ور شدن کل نمونه و متورم شدن نمونه باید کافی باشد. در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که اثر متقابل توان-زمان، توان-وزن نمونه، توان-حجم حلال، زمان-وزن نمونه، زمان-حجم حلال و وزن نمونه-حجم حلال بر بازدهی عصاره‌ها معنی‌دار بودند.

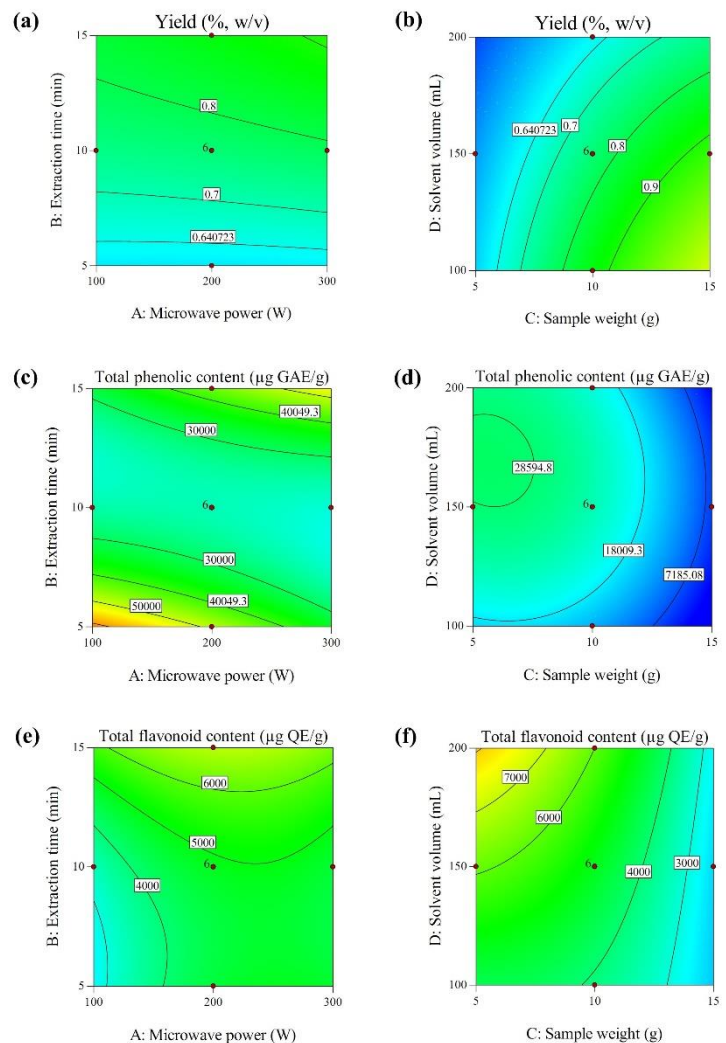


Fig. 2. Effect of different microwave-assisted extraction conditions on extraction yield, total phenolic content, and total flavonoid content of extracts of bitter orange seed cotyledon.

نسبت‌های ۱:۱، ۱:۱۵، ۱:۲۰، ۱:۲۵ و ۱:۳۰ میلی لیتر بر گرم) بر استخراج میزان فنل کل از پوست انار اثر مثبت داشت. علت این امر، زیاد شدن سطح تماس حلال و نمونه با افزایش حجم حلال، و در نتیجه فراهم شدن امکان استخراج بیشتر ترکیبات مدنظر می‌باشد [۱۹]. به عبارت دیگر، نسبت مایع به جامد عاملی مهم در فرآیند استخراج می‌باشد. بالاتر بودن میزان فنل کل به این دلیل است که حجم بیشتری از حلال برای حل شدن ترکیبات در دسترس می‌باشد (اصل تعادل<sup>۱۹</sup>) [۲۰]. در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که اثر متقابل توان-زمان و زمان-وزن نمونه بر میزان فنل کل عصاره‌ها معنی‌دار بودند.

### ۳-۴- میزان فلاونوئید کل

در دانه نارنج، نارینجین و نئوهیپریدین به‌عنوان بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی و همچنین مقادیر قابل توجهی فلاونول‌ها (کوئرستین، روتین و کمپفرول) و فلاونول‌ها (کاتچین و اپی گالوکاتچین) شناسایی شده‌اند [۳۷]. شکل‌های ۲ (e-f)، اثر توان میکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال بر میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها را نشان می‌دهند. تمام متغیرها اثر معنی‌داری بر میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها داشتند. با افزایش توان از ۱۰۰ به ۲۰۰ وات، میزان فلاونوئید کل افزایش و سپس با افزایش بیشتر در توان، میزان فلاونوئید کل کاهش یافت. افزایش زمان استخراج منجر به افزایش میزان فلاونوئید کل شد. با افزایش وزن نمونه، میزان فلاونوئید کل کاهش یافت. میزان فلاونوئید کل با افزایش حجم حلال افزایش یافت. حداکثر و حداقل میزان فلاونوئید کل به ترتیب ۹۹۷۶/۶۹ و ۲۵۱/۴۸ میکروگرم معادل کوئرستین بر گرم بود. افزایش توان از ۱۰۰ به ۲۰۰ وات، باعث افزایش میزان فلاونوئید کل شد، درحالی‌که افزایش بیشتر سطح توان، میزان فلاونوئید کل را کاهش داد. Kumar و Mali گزارش کردند که توان ۳۰۰ وات میکروویو (از بین توان‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰، ۶۰۰ و ۷۵۰ وات) اثر

متفاوت بودن خواص جذب مایکروویو و یا ضریب نفوذ و افت، احتمالاً گرمایش انتخابی یا افتراقی در ماده رخ داده و کاهش اسیدهای فنلیک متصل به علت اثر گرمایش ناشی از تشعشعات الکترومغناطیسی باشد. همچنین، اگر اسیدهای فنلیک انرژی مایکروویو را جذب نکرده باشند، نیروهای جاذب فیزیکی بین اسیدهای فنلیک با ترکیبات آلی، غیر آلی و آب درون ماتریس گیاه، و همچنین ناپایداری حرارتی می‌توانند در کاهش میزان اسیدهای فنلیک متصل نقش داشته باشند. همچنین، آن‌ها کاهش میزان اسیدهای فنلیک کل (مجموع اسیدهای فنلیک آزاد و متصل) با افزایش توان و زمان را به از بین رفتن برخی از اسیدهای فنلیک با حرارت-دهی مایکروویو نسبت دادند [۲۵]. همچنین، Dahmoune و همکاران مشاهده کردند اگرچه با افزایش توان مایکروویو از ۳۰۰ به ۴۰۰ وات، میزان فنل کل در عصاره پسماند لیمو افزایش یافت، اما در توان‌های بیشتر، میزان فنل کل کاهش یافت که به دلیل تخریب حرارتی ترکیبات زیست‌فعال در توان‌های بالاتر بود [۲۴]. با این حال، Sharma و Dash در بررسی سرعت استخراج ترکیبات فنلی از پالپ جامون سیاه به کمک مایکروویو طی مدت زمان ۴ دقیقه دریافتند که سرعت استخراج در ابتدا سریع و پس از یک دوره زمانی، کند می‌شود. بالا بودن سرعت در ابتدا به دلیل استخراج ترکیبات فنلی از سطح بیرونی نمونه بوده و کاهش سرعت پس از پیشرفت فرآیند استخراج به دلیل کنترل شدن استخراج به وسیله پدیده انتشار می‌باشد [۱۸].

نتایج بیان‌گر افزایش میزان فنل کل با افزایش حجم حلال تا حد مشخص (۱۵۰ میلی لیتر) می‌باشد. افزایش حجم حلال باعث تورم موثرتر سلول‌های گیاهی و استخراج کارآمدتر ترکیبات فنلی می‌شود. با این حال، با افزایش بیش از حد حجم حلال، حلال انرژی بیشتری را جذب کرده که در نتیجه، جذب مایکروویو توسط مواد گیاهی کاهش یافته که منجر به کاهش میزان فنل کل می‌شود [۳۱]. در این خصوص، Mali و Kumar گزارش کردند که افزایش نسبت حلال به نمونه از ۱:۱۵ به ۱:۲۰ میلی لیتر به گرم (از میان

### ۳-۵- ویژگی‌های پاداکسندگی

چندین روش تعیین فعالیت پاداکسندگی بر اساس مکانیسم‌های عمل<sup>۲۰</sup> مختلف توسعه یافته‌اند. از نقطه نظر ساز و کار، این روش‌ها به دو دسته اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱- واکنش انتقال تک الکترون<sup>۲۱</sup> ۲- واکنش انتقال اتم هیدروژن<sup>۲۲</sup> [۳۹]. روش‌های مبتنی بر انتقال تک الکترون، توانایی یک پاداکسنده را اندازه‌گیری می‌کنند. این روش‌ها یک الکترون را برای احیای هر ترکیبی از جمله یون‌های فلزی، گروه‌های کربونیل و رادیکال‌ها انتقال می‌دهند. مکانیسم‌های انتقال تک الکترون و انتقال اتم هیدروژن تقریباً در هر زمان در همه نمونه‌ها با هم رخ می‌دهند. روش‌های مبتنی بر انتقال تک الکترون شامل سنجش‌های زیر می‌شوند: میزان فنل کل با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو، قدرت احیای یون فریک، مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت احیای یون مس [۳۶].

### ۳-۵-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

امروزه روش DPPH از رایج‌ترین روش‌های سنجش پاداکسندگی مهارکننده رادیکال‌های آزاد است. مقدار  $IC_{50}$  به صورت غلظت پاداکسنده موثر مورد نیاز برای کاهش غلظت اولیه رادیکال آزاد DPPH تا ۵۰ درصد تعریف می‌شود. هر چه این مقدار کمتر باشد، ظرفیت پاداکسندگی بالاتر می‌باشد [۳۶].

شکل‌های ۳ (a-b) اثر توان میکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال بر میزان  $IC_{50}$  عصاره‌ها را نشان می‌دهند. متغیرهای زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال اثر معنی‌داری بر  $IC_{50}$  عصاره‌ها داشتند. در کمترین توان میکروویو (۱۰۰ وات) کمترین میزان  $IC_{50}$  مشاهده گردید. با افزایش زمان استخراج، میزان  $IC_{50}$  کاهش یافت. افزایش وزن نمونه منجر به افزایش میزان  $IC_{50}$  شد. با افزایش حجم حلال، میزان  $IC_{50}$  کاهش یافت. حداقل و حداکثر میزان  $IC_{50}$  به ترتیب ۱۱/۱۰ و ۷۵/۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. از

معنی‌داری بر میزان فلاونوئید کل پوست انار داشت. در توان بالاتر از ۱۵۰ وات (یعنی ۳۰۰ وات)، مخلوط گرم شده که باعث انتقال اجزای فلاونوئیدی از سلول به حلال می‌شود، درحالی‌که قرار گرفتن فلاونوئیدها در معرض توان بالاتر از ۳۰۰ وات، به دلیل گرم شدن بیش از حد نمونه‌ها منجر به از بین رفتن ترکیبات حساس به حرارت مانند فلاونوئیدها می‌شود [۱۹]. علاوه بر این، مشاهدات Singh و همکاران بیان‌گر افزایش میزان فلاونوئید کل در استخراج ترکیبات زیست‌فعال از پوست گردو با افزایش توان میکروویو تا ۳۲۰ وات (از بین توان‌های ۱۶۰ تا ۴۸۰ وات)، به دلیل حرارت و فشار موضعی ایجاد شده توسط میکروویو بود [۳۸].

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد با افزایش زمان استخراج و حجم حلال، میزان فلاونوئید کل عصاره‌های مغز دانه نارنج افزایش می‌یابد. در این راستا، Aşperger و همکاران، در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست انگور به کمک میکروویو دریافتند که زمان استخراج ۵ تا ۱۵ دقیقه مناسب بوده اما با افزایش بیشتر زمان استخراج، میزان فلاونول‌ها و فلاوان-۳-ال‌ها کاهش یافته که به دلیل ناپایداری حرارتی در زمان‌های طولانی‌تر استخراج می‌باشد [۲۱]. هم‌چنین، Bansod و همکاران در بررسی استخراج ترکیبات زیست-فعال از پسماند پوست آناناس به کمک میکروویو متوجه شدند که افزایش نسبت حلال به نمونه (از ۱۰:۱ به ۲۰:۱ میلی لیتر بر گرم) باعث ایجاد اختلاف غلظت بین درون سلول‌های گیاهی و محیط بیرونی (حلال) شده که به نوبه خود سرعت انتقال جرم را افزایش، و در نتیجه میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی را افزایش می‌دهد [۱۷]. علاوه بر این، میزان بالاتر نسبت مایع به جامد، اختلاط همگن را تضمین کرده و منجر به نفوذ حلال به قسمت‌های داخلی نمونه می‌شود [۳۵]. در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که اثر متقابل زمان-حجم حلال و وزن نمونه-حجم حلال بر میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها معنی‌دار بودند.

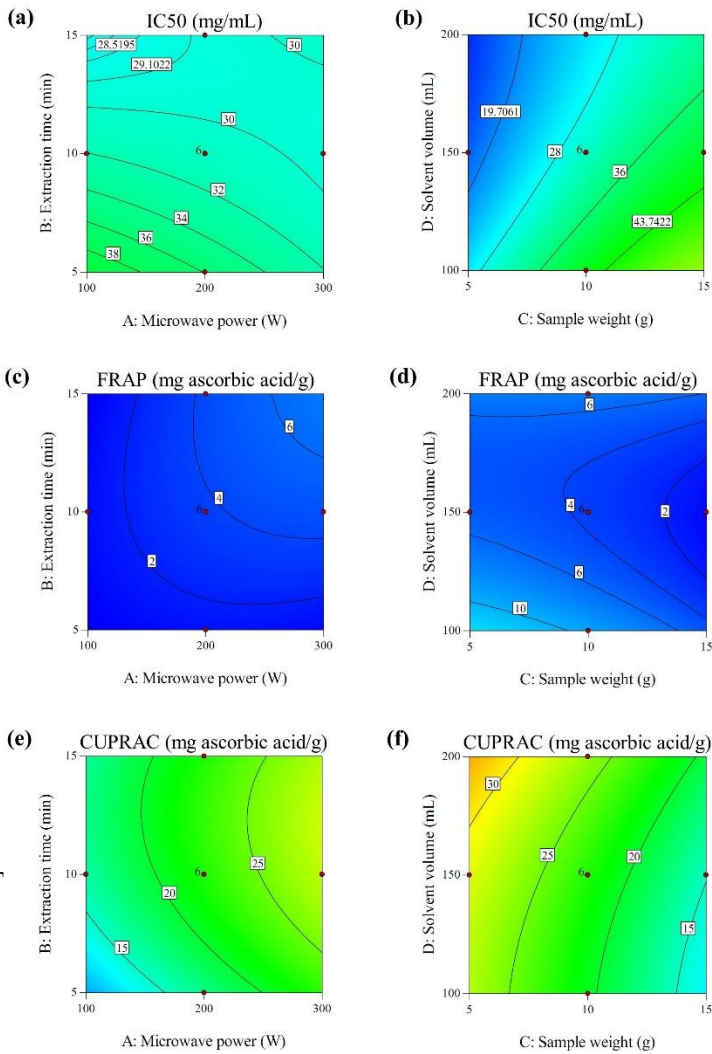


Fig. 3. Effect of different microwave-assisted extraction conditions on  $IC_{50}$ , ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), and cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) of extracts of bitter orange seed cotyledon.

### ۳-۵-۲- قدرت احیای یون فریک

قدرت احیاکنندگی یون فریک توسط ترکیبات زیست-فعال نشان دهنده ظرفیت اهدای الکترون بوده و با فعالیت پاداکسندگی مرتبط است. ترکیبات زیست فعال با اثرات پاداکسندگی می توانند احیاکننده و اکسیدان غیرفعال باشند. ظرفیت احیاکنندگی یک ترکیب به عنوان شاخصی قابل توجه از فعالیت پاداکسندگی بالقوه در نظر گرفته می شود [۳۶].

آنجایی که در کمترین سطح توان مایکروویو، ترکیبات فنلی بیشتر و با افزایش زمان استخراج، ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری استخراج شد، از این رو می توان افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال را به مشارکت این ترکیبات نسبت داد. یک بررسی نشان داده است که فعالیت پاداکسندگی دانه نارنج (مهار رادیکال آزاد DPPH) با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی همبستگی دارد [۳۷]. Kurtulbaş و همکاران در بررسی استخراج عصاره از پوست آلبالو به کمک مایکروویو دریافتند که افزایش زمان استخراج (در حداکثر زمان ۹۰ ثانیه در توان های ۳۵۰ تا ۵۰۰ وات) منجر به افزایش فعالیت پاداکسندگی از طریق ارزیابی مهار رادیکال آزاد DPPH شد که با میزان استخراج ترکیبات فنلی همخوانی داشت [۲۲]. هم چنین، Baiano و همکاران، بالاترین میزان فعالیت پاداکسندگی (مهار رادیکال آزاد DPPH) را در زمان استخراج ۴ دقیقه (از بین زمان های ۲ و ۴ دقیقه) و نسبت جامد به مایع ۱:۲ (از میان نسبت های ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۴) برای عصاره های استخراج شده از پسماند جامد گل کلم، کرفس و کاسنی همراه با افزایش میزان فنل کل تشخیص دادند. آن ها بیان کردند که افزایش میزان فنل کل به دلیل تغییر در ضریب فعالیت<sup>۲۳</sup> -توصیف کننده برهم کنش بین مولکولی بین حل-شونده و حلال- و در نتیجه تغییر در حلالیت ترکیبات پاداکسندگی با تغییر نسبت جامد به مایع و افزایش زمان تماس نمونه و حلال با تغییر زمان استخراج می باشد [۲۳].

نتایج حاکی از کاهش میزان  $IC_{50}$  در حجم های بالاتر حلال بود. پایین بودن حجم حلال منجر به استخراج ناقص ترکیبات پاداکسندگی موثر به دلیل کاهش سطح تماس می شود. به عبارت دیگر، حجم مناسب حلال می تواند منجر به افزایش تورم ماده شود که برای افزایش سطح تماس بین فازها مطلوب می باشد [۴۰]. در مطالعه ای حاضر مشخص شد که اثر متقابل توان-زمان، توان-حجم حلال، زمان-وزن نمونه، زمان-حجم حلال و وزن نمونه-حجم حلال بر میزان  $IC_{50}$  عصاره ها معنی دار بودند.

این روش مبتنی بر توانایی احیای Cu (II) به Cu (I) در حضور یک لیگاند تثبیت کننده Cu (I) انتخابی، نئوکوپرین (۲،۹-دی متیل-۱،۱۰-فئاترولین) می باشد [۳۹]. کوپراک روشی مبتنی بر پتانسیل اکسیداسیون-احیای غیررادیکالی است. یون  $Cu^{2+}$  دارای پتانسیل اکسیداسیون-احیایی (۰/۱۶ ولت) کمتر از یون  $Fe^{3+}$  بوده که باعث می شود واکنش کوپراک انتخابی تر از واکنش قدرت احیای یون فریک باشد [۴۱].

اثر توان میکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال بر ظرفیت احیای یون مس در شکل های ۳ (e-f) نشان داده شده است. تمام متغیرها اثر معنی داری بر ظرفیت احیای یون مس عصاره ها داشتند. با افزایش توان میکروویو، ظرفیت احیای یون مس افزایش یافت. افزایش زمان استخراج نیز منجر به افزایش ظرفیت احیای یون مس شد. افزایش وزن نمونه، ظرفیت احیای یون مس را کاهش داد. با افزایش حجم حلال، ظرفیت احیای یون مس افزایش یافت. حداکثر ظرفیت احیای یون مس ۳۷/۸۶ و حداقل آن ۵/۰۲ میلی گرم اسید آسکوربیک بر گرم بود. بنابراین، کاربرد توان بالای میکروویو همراه با زمان های طولانی تر استخراج، منجر به استخراج کارآمدتر ترکیبات موثر در احیای یون مس می شود. اثر متقابل توان-وزن نمونه بر ظرفیت احیای یون مس عصاره ها معنی دار بود.

### ۳-۵-۴- ظرفیت کلاته کنندگی

ظرفیت کلاته کردن فلز با اندازه گیری اثر کلاته کنندگی پاداکسنده ها با یون های فلزی از جمله یون فروس ( $Fe^{2+}$ ) تعیین شده و به عنوان شاخصی از فعالیت پاداکسندگی، معمولاً در ترکیب با سایر سنجش های پاداکسندگی استفاده می شود. گونه های عنصری می توانند تولید گونه های فعال اکسیژن در سیستم های حیوانی و انسانی را تسهیل کنند. در نتیجه، توانایی مواد در کلاته کردن آهن می تواند یک

اگرچه این روش مستقیماً از رادیکال های آزاد استفاده نمی کند، اما در درون بدن، تبدیل Fe (III) به Fe (II) در فرآیند اکسیداسیون لیپید نقش دارد [۳۹].

اثر توان میکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال بر قدرت احیای یون فریک عصاره ها در شکل های ۳ (c-d) نشان داده شده است. تمام متغیرها اثر معنی داری بر قدرت احیای یون فریک عصاره ها داشتند. افزایش توان میکروویو منجر به افزایش قدرت احیای یون فریک شد. با افزایش زمان استخراج از ۵ به ۱۵ دقیقه نیز قدرت احیای یون فریک افزایش یافت. افزایش وزن نمونه، قدرت احیای یون فریک را کاهش داد. با افزایش حجم حلال تا ۱۵۰ میلی لیتر، قدرت احیای یون فریک کاهش، و سپس افزایش یافت. حداکثر قدرت احیای یون فریک ۵۵/۸۶ و حداقل آن ۰/۲۸ میلی گرم اسید آسکوربیک بر گرم بود. از آنجایی که در توان های بالا و زمان های طولانی تر استخراج، قدرت احیای یون فریک افزایش می یابد، در نتیجه علاوه بر ترکیبات فنلی، سایر پاداکسنده های هم زمان استخراج شده<sup>۲۴</sup> (مانند آلفا-توکوفرول) در بالاتر بودن قدرت احیای یون فریک عصاره ها نقش داشته اند. همان طور که در مطالعه ای انجام شده توسط Mellinas و همکاران مشخص شد، pH، زمان استخراج و نسبت جامد به مایع به شکل معنی داری بر قدرت احیای یون فریک عصاره استخراج شده از پسماند پوسته دانه کاکائو موثر بوده و بالاتر بودن قدرت احیای یون فریک در pH بالاتر، به دلیل وجود پاداکسنده های هم زمان استخراج شده (مانند پلی ساکاریدها)، علاوه بر وجود پلی فنل ها می باشد [۳۳]. در مطالعه ای حاضر مشخص شد که اثر متقابل توان-زمان، توان-وزن نمونه، توان-حجم حلال، زمان-وزن نمونه، زمان-حجم حلال و وزن نمونه-حجم حلال بر قدرت احیای یون فریک عصاره ها معنی دار بودند.

### ۳-۵-۳- ظرفیت احیای یون مس

می‌دهد. متغیرهای زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال اثر معنی‌داری بر ظرفیت کلاته‌کنندگی عصاره‌ها داشتند. در کمترین توان مایکروویو (۱۰۰ وات) بیشترین ظرفیت کلاته-کنندگی مشاهده شد. بیشترین ظرفیت کلاته‌کنندگی مربوط به بالاترین زمان استخراج بود. افزایش وزن نمونه در ابتدا منجر به افزایش ظرفیت کلاته‌کنندگی و سپس منجر به کاهش میزان آن شد. افزایش حجم حلال، ظرفیت کلاته‌کنندگی را افزایش داد. حداکثر و حداقل ظرفیت کلاته‌کنندگی به ترتیب حجم حلال و زمان-حجم حلال بر ظرفیت کلاته‌کنندگی عصاره‌ها معنی‌دار بودند.

خاصیت پاداکسندگی ارزشمند باشد. در میان فلزهای واسطه، آهن به دلیل واکنش‌پذیری بالا، به‌عنوان مهم‌ترین پراکسیدان لیپیدی شناخته می‌شود [۳۶]. فلاونوئیدها و اسیدهای فنلیک با قدرت پاداکسندگی بالا دارای یک گروه کربوکسیلیک اسید (برای اسیدها) و یا یک گروه هیدروکسیلِ نزدیک و یک گروه اکسو (برای فلاونوئیدها) در ساختار خود بوده و قادر به کوئوردینانس شدن با مراکز فلزی که کمپلکس‌های پایدار تشکیل می‌دهند هستند. بسیاری از فلاونوئیدها و اسیدهای فنلیک از طریق کوئوردینانس اتم‌های اکسیژن به‌عنوان کلات با فلز پیوند تشکیل می‌دهند [۴۱].

شکل ۴، اثر توان مایکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال بر ظرفیت کلاته‌کنندگی عصاره‌ها را نشان

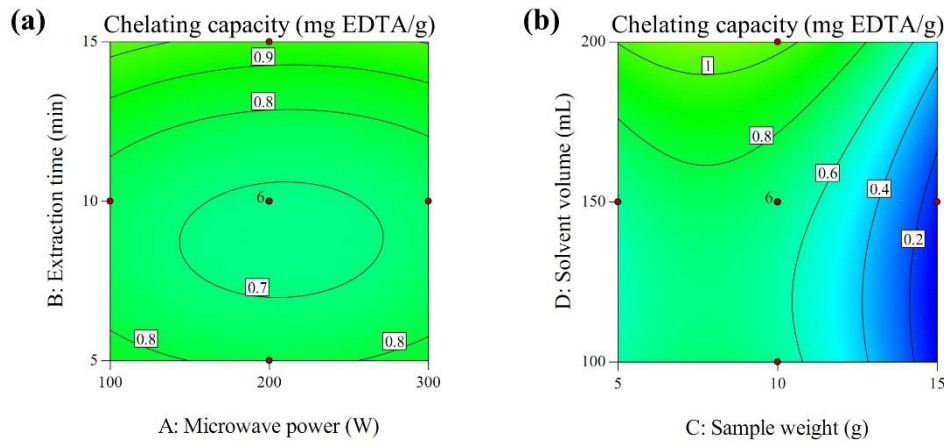


Fig. 4. Effect of different microwave-assisted extraction conditions on the chelating capacity of extracts of bitter orange seed cotyledon.

### ۳-۷- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی روش استخراج به کمک

#### مایکروویو

روش سطح پاسخ مبتنی بر طرح مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی شرایط استخراج به کمک مایکروویو استفاده شد. شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو با حداکثر در نظر گرفتن میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل، قدرت احیای یون فریک، ظرفیت احیای یون مس و فعالیت کلاته‌کنندگی و هم‌زمان با حداقل در نظر گرفتن میزان  $IC_{50}$  تعیین شد. شرایط

### ۳-۶- ویژگی‌های فیزیکی

پاسخ ویژگی‌های فیزیکی پژوهش حاضر در جدول ۱ نشان داده شده است. اعداد روشنایی ( $L^*$ ) در محدوده ۷۳/۰۰-۵۳/۰۰، اعداد قرمزی-سبزی ( $a^*$ ) در محدوده ۰/۰۰-۴/۰۰- و اعداد زردی-آبی ( $b^*$ ) در محدوده ۱۲/۰۰-۴/۰۰ قرار دارند. اعداد pH، ضریب شکست و دانسیته عصاره‌ها نیز به ترتیب در محدوده ۷/۸۲-۷/۶۱، ۱/۳۴۰۰-۱/۳۲۹۹ و ۰/۷۰۸-۰/۸۹۰ گرم بر سانتی‌متر مکعب بودند.

حداکثر رساندن ترکیباتی خاص مانند میزان فنل کل نمی- باشد. به عبارتی، بتوان عصاره‌ای با میزان فنل کل در سطح قابل قبول استخراج کرد. از آنجایی که عوامل مورد مطالعه می‌توانند به پاسخ‌های متضاد منجر شوند مانند اینکه به حداکثر رساندن یک شاخص منجر به کاهش میزان فنل کل شود و یا بالعکس، پیشنهاد می‌شود در بهینه‌سازی فرآیند کلی استخراج تمام پاسخ‌های مدنظر به صورت یکپارچه در نظر گرفته شوند [۲۰].

بهینه پیش‌بینی شده توسط نرم افزار، توان مایکروویو ۳۰۰ وات، زمان استخراج ۱۵ دقیقه، وزن نمونه ۵ گرم و حجم حلال ۲۰۰ میلی لیتر بود. آزمایش‌های تاییدی (راستی آزمایی)<sup>۲۵</sup> در شرایط بهینه‌ی به دست آمده انجام شد. مقادیر تجربی به دست آمده در شرایط بهینه، کاملاً نزدیک به مقادیر بهینه پیش‌بینی شده (جدول ۳) بود. از نقطه نظر کاربردی، در بهینه‌سازی فرآیند استخراج بایستی به هر دو شاخص کمیت و کیفیت عصاره‌ها توجه شود. هدف از بهینه‌سازی، تنها به

Table 3. Comparison between the optimum condition of microwave-assisted extraction from bitter orange seed cotyledon with the model as well as the electromantle.

Response	Experimental (Microwave)	Predicted (model)	Error (%)	Electromantle	Error (%)
TPC <sup>1</sup> (µg GAE/g)	51268.00	52544.20	2.49	53088.84	3.55
TFC <sup>2</sup> (µg QE/g)	9651.80	9959.33	3.19	9938.28	2.97
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	28.13	26.81	-4.69	27.56	-2.03
FRAP <sup>3</sup> (mg ascorbic acid/g)	9.84	10.34	5.08	10.08	2.44
CUPRAC <sup>4</sup> (mg ascorbic acid/g)	37.91	40.58	7.04	40.02	5.57
Chelating capacity (mg EDTA/g)	1.30	1.38	6.15	1.39	6.92

<sup>1</sup>Total phenolic content; <sup>2</sup>Total flavonoid content; <sup>3</sup>Ferric ion reducing antioxidant power; <sup>4</sup>Cupric ion reducing antioxidant capacity.

جامد به مایع می‌باشد. در روش استخراج به کمک مایکروویو، اجزای نمونه با هدایت یونی و چرخش دوقطبی توسط انرژی مایکروویو گرم شده و بنابراین استخراج مستقیماً با حساسیت دی الکتریک حلال و ماتریس نمونه متناسب است. در فرآیند استخراج به روش مایکروویو، برخلاف فرآیند استخراج مرسوم که در آن گرما از منبع گرمایش به داخل نمونه منتقل می‌شود، حرارت به صورت حجمی، درون نمونه ایجاد می‌شود [۵، ۱۲، ۱۴].

### ۳-۸- مقایسه روش استخراج به کمک مایکروویو با روش الکتروموتل

ابتدا آزمون تجربی در شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو برای بررسی مناسب بودن مدل انجام شد. سپس، با ویژگی‌های عصاره به دست آمده از روش استخراج به کمک الکتروموتل در شرایط بهینه مقایسه شد. نتایج عصاره استخراج شده به کمک مایکروویو با نتایج روش الکتروموتل نزدیک بود (جدول ۳). با این حال، باید این نکته مدنظر قرار گیرد که مکانیسم استخراج ترکیبات به کمک مایکروویو با روش مرسوم (الکتروموتل) متفاوت است (شکل ۵). در روش استخراج مرسوم، دیواره سلول گیاهی نرم شده و می‌شکند تا ترکیبات شیمیایی طبیعی موجود در گیاه<sup>۲۶</sup> آزاد و رها شوند. در این روش، گرما از طریق جابجایی و هدایت تامین شده و شامل یک شیب غلظت طی عبور ترکیبات هدف از فاز



مایکروویو مورد بررسی قرار گرفت. طرح آزمایش شامل توان مایکروویو، زمان استخراج، وزن نمونه و حجم حلال به‌عنوان متغیرهای مستقل و بازدهی استخراج، میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل، میزان  $IC_{50}$ ، قدرت احیای یون فریک، ظرفیت احیای یون مس، ظرفیت کلاته‌کنندگی و ویژگی‌های فیزیکی به‌عنوان پاسخ‌های آزمایش بودند. نتایج نشان داد که شرایط بهینه استخراج شامل توان مایکروویو ۳۰۰ وات، زمان استخراج ۱۵ دقیقه، وزن نمونه ۵ گرم و حجم حلال ۲۰۰ میلی لیتر می‌باشد. بررسی اعتبارسنجی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین داده‌های پیش‌بینی شده حاصل از نرم افزار با داده‌های تجربی انجام شده وجود ندارد. فرآیند استخراج به کمک مایکروویو می‌تواند به‌عنوان روشی سریع و کارآمد برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از پسماند دانه نارنج استفاده شود.

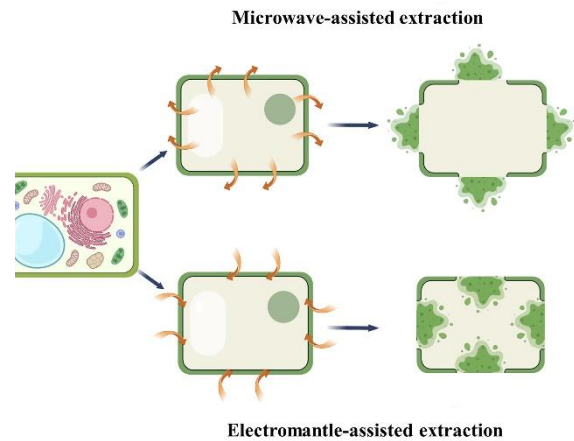


Fig. 5. Mechanism of action for compound extraction via microwave- and electromantle-assisted extraction methods.

#### ۴- نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه‌ی حاضر، استخراج ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت پاداکسندگی عصاره مغز دانه نارنج به کمک

#### ۶- منابع

- [1] Choden, D., & Dendup, W. (2023). Value addition to industrial food processing waste. In *Value-addition in agri-food industry waste through enzyme technology*. Kuddus, M., & Ramteke, P. (Eds.) United Kingdom: Academic Press. pp. 153-162.
- [2] FAOSTAT. (2021). Food and Agriculture Organization of the United Nations/Statics. <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- [3] Kumar, K. (2020). Nutraceutical potential and utilization aspects of food industry by-products and wastes. In *Food industry wastes: Assessment and recuperation of commodities*. Kosseva, M. R., & Webb, C. (Eds.). Second edition. United Kingdom: Academic Press. pp. 89-111.
- [4] Ahmed, N. (2023). Extraction of bioactive compounds from agro-industrial waste. In *Extraction of natural products from agro-industrial wastes: A green and sustainable approach*. Bhawani, S., Khan, A., & Ahmad, F. (Eds.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. pp. 131-142.
- [5] Junaid, P. M., Dar, A. H., Dar, I. H., Khan, S. A., Manzoor, A., Ganaie, T. A., & Shams, R. (2023). Extraction of antioxidants from agro-industrial waste. In *Extraction of natural products from agro-industrial wastes: A green and sustainable approach*. Bhawani, S., Khan, A., & Ahmad, F. (Eds.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. pp. 143-156.
- [6] González-Miquel, M., & Díaz, I. (2020). Valorization of citrus waste through sustainable extraction processes. In *Food industry wastes: Assessment and recuperation of commodities*. Kosseva, M. R., & Webb, C. (Eds.). Second edition. United Kingdom: Academic Press. pp. 113-133.
- [7] Suri, S., Singh, A., & Nema, P. K. (2022). Current applications of citrus fruit processing waste: A scientific outlook. *Applied Food Research*, 2, 100050.
- [8] Farag, M. A., Abib, B., Ayad, L., & Khattab, A. R. (2020). Sweet and bitter oranges: An updated comparative review of their bioactives, nutrition, food quality, therapeutic merits and biowaste valorization practices. *Food Chemistry*, 331, 127306.
- [9] ISIRI. (July 2000). No. 177. Sour orange specification and test methods. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 1st revision.
- [10] Chen, Y., Barzee, T. J., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Citrus. In *Integrated processing technologies for food and agricultural by-*

- products*. Pan, Z., Zhang, R., & Zicari, S. (Eds.). United Kingdom: Academic Press. pp. 217-242.
- [11] Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., & Cho, M. H. (2018). Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. *Journal of Functional Foods*, 40, 307-316.
- [12] El Kantar, S., Pasdar, N., Sharifi, A., Taherkhani, A., & Koubaa, M. (2023). Application of high-voltage electrical discharges for the extraction of valuable compounds from by-products of citrus and exotic fruits. In *Processing of food products and wastes with high voltage electrical discharges*. Vorobiev, E., Boussetta, N., & Lebovka, N. (Eds.). United Kingdom: Academic Press. pp. 153-172.
- [13] Purkait, M. K., Haldar, D., & Duarah, P. (Eds.). (2023). Chapter 4. Advancement in bioactive compound extraction from natural products for pharmaceutical applications. *Advances in Extraction and Applications of Bioactive Phytochemicals*. United Kingdom: Academic Press. pp. 75-99.
- [14] Hasnat, A., Moheman, A., Usmani, M. A., Ansari, A., Bhawani, S. A., Tariq, A., & Alotaibi, K. M. (2023). Solvent extraction of natural products. In *Extraction of natural products from agro-industrial wastes: A green and sustainable approach*. Bhawani, S., Khan, A., & Ahmad, F. (Eds.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. pp. 91-110.
- [15] Sheikh, M. A., Anjum, N., Gull, A., Saini, C. S., & Sharma, H. K. (2023). Extraction of lycopene from agro-industrial waste. In *Extraction of natural products from agro-industrial wastes: A green and sustainable approach*. Bhawani, S., Khan, A., & Ahmad, F. (Eds.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. pp. 179-196.
- [16] Fierascu, I., Avramescu, S. M., Sieniawska, E., & Fierascu, R. C. (2023). Ionic liquids with microwave-assisted extraction of natural products. In *Extraction of natural products from agro-industrial wastes: A green and sustainable approach*. Bhawani, S., Khan, A., & Ahmad, F. (Eds.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. pp. 35-52.
- [17] Bansod, S. P., Parikh, J. K., & Sarangi, P. K. (2023). Pineapple peel waste valorization for extraction of bio-active compounds and protein: Microwave assisted method and Box Behnken design optimization. *Environmental Research*, 221, 115237.
- [18] Sharma, M., & Dash, K. K. (2022). Microwave and ultrasound assisted extraction of phytochemicals from black jamun pulp: Kinetic and thermodynamics characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 75, 102913.
- [19] Mali, P. S., & Kumar, P. (2023). Simulation and experimentation on parameters influencing microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Punica granatum* waste and its preliminary analysis. *Food Chemistry Advances*, 3, 100344.
- [20] Tomasi, I. T., Santos, S. C. R., Boaventura, R. A. R., & Botelho, C. M. S. (2023). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from chestnut processing waste using response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, 395, 136452.
- [21] Ašperger, D., Gavrančić, M., Prišlin, B., Rendulić, N., Šikuten, I., Marković, Z., Babić, B., Maletić, E., Karoglan-Kontić, J., Preiner, D., & Tomaz, I. (2022). Optimization of microwave-assisted extraction and matrix solid-phase dispersion for the extraction of polyphenolic compounds from grape skin. *Separations*, 9, 235.
- [22] Kurtulbaş, E., Bilgin, M., & Şahin, S. (2021). Recovery of anthocyanins from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) peels via microwave assisted extraction: Monitoring the storage stability. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51, 686-696.
- [23] Baiano, A., Bevilacqua, L., Terracone, C., Contò, F., & Del Nobile, M. A. (2014). Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. *Journal of Food Engineering*, 120, 135-145.
- [24] Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., & Madani, K. (2013). Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50, 77-87.
- [25] Hayat, K., Zhang, X., Chen, H., Xia, S., Jia, C., & Zhong, F. (2010). Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 73, 371-376.
- [26] AACC. (2000). American Association of Cereal Chemists. Approved Methods Committee.
- [27] Habibi, M., Golmakani, M. -T., Mesbahi, G., Majzoobi, M., & Farahnaky, A. (2015). Ultrasound-accelerated debittering of olive

- fruits. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 105-115.
- [28] Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Pavithra Devi, J., Vijay Kumar, H. T., & Prashith Kekuda, T. R. (2012). Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions*, 1, 303-310.
- [29] Pascu, M., Pascu, D. E., Trăistaru, G. A., Nechifor, A. C., Bunaciu, A. A., & Aboul-Enein, H. Y. (2014). Different spectrophotometric methods for antioxidant activity assay of four Romanian herbs. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 11, 315-321.
- [30] Oyetayo, V., Dong, C. -H., & Yao, Y. -J. (2009). Antioxidant and antimicrobial properties of aqueous extract from *Dictyophora indusiata*. *The Open Mycology Journal*, 3, 20-26.
- [31] Milutinović, M., Radovanović, N., Ćorović, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2015). Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Industrial Crops and Products*, 77, 333-341.
- [32] Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2014). Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers*, 101, 786-791.
- [33] Mellinas, A. C., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2020). Optimization of microwave-assisted extraction of cocoa bean shell waste and evaluation of its antioxidant, physicochemical and functional properties. *LWT*, 127, 109361.
- [34] Elakremi, M., Sillero, L., Ayed, L., Ben Mosbah, M., Labidi, J., ben Salem, R., & Moussaoui, Y. (2022). *Pistacia vera* L. leaves as a renewable source of bioactive compounds via microwave assisted extraction. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100815.
- [35] Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., & Goula, A. M. (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 137, 1-11.
- [36] Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651-715.
- [37] Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.
- [38] Singh, R., Singh, P., Pandey, V. K., Dash, K. K., Ashish, Mukarram, S. A., Harsányi, E., & Kovács, B. (2023). Microwave-Assisted Phytochemical Extraction from Walnut Hull and Process Optimization Using Box-Behnken Design (BBD). *Processes*, 11, 1243.
- [39] Sánchez-Ayora, H., & Pérez-Jiménez, J. (2023). Antioxidant capacity of seaweeds: *In vitro* and *in vivo* assessment. In *Marine Phenolic Compounds: Science and engineering*. Pérez-Correa, J. R., Mateos, R., & Domínguez, H. (Eds.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. pp. 299-341.
- [40] Valdés, A., Vidal, L., Beltrán, A., Canals, A., & Garrigós, M. C. (2015). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from almond skin byproducts (*Prunus amygdalus*): A multivariate analysis approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5395-5402.
- [41] Marchi, R. C., Campos, I. A., Santana, V. T., & Carlos, R. M. (2022). Chemical implications and considerations on techniques used to assess the *in vitro* antioxidant activity of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 451, 214275.



## Scientific Research

## Microwave-assisted extraction of bioactive compounds from bitter orange seed cotyledon and evaluating their antioxidant properties

Mohammad-Taghi Golmakani<sup>\*1</sup>, Azita Hosseinzadeh Farbudi<sup>2</sup>, Gholamreza Mesbahi<sup>3</sup>, Seyedeh Nasireh Alavi<sup>4</sup>

1-PhD, Full Professor, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University

2-MSc, Graduated, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University

3-MSc, Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University

4-PhD, Graduated, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

## Article History:

Received: 2023/7/25

Accepted: 2023/10/10

## Keywords:

Extraction,  
Microwave,  
Bitter orange seed cotyledon,  
Citrus wastes,  
Antioxidant.

DOI: 10.22034/FSCT.21.146.138

\*Corresponding Author E-Mail:  
[golmakani@shirazu.ac.ir](mailto:golmakani@shirazu.ac.ir)

In the present study, bioactive compounds were extracted from cotyledon of bitter orange (*Citrus aurantium*) seed, as a waste of citrus processing, using a microwave-assisted extraction method. The effects of four independent variables including microwave power (100-300 W), extraction time (5-15 min), sample weight (5-15 g), and solvent volume (100-200 mL) on responses of extraction yield, total phenolic content, total flavonoid content, free radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>), ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC), and chelating capacity of extracts were investigated. Response surface methodology based on the central composite design was employed to investigate the effects of independent variables on the responses and also to optimize the extraction conditions. The optimum extraction condition included microwave power of 300 W, extraction time of 15 min, sample weight of 5 g, and solvent volume of 200 mL. Regarding the extraction yield, its amount increased significantly by increasing microwave power, extraction time, and sample weight, while it decreased significantly by increasing solvent volume. Also, the highest total phenolic content in the extract was observed at the lowest levels of microwave power and extraction time. Concerning the total flavonoid content in the extract, its amount increased significantly by increasing extraction time and solvent volume, while it decreased significantly by increasing sample weight. In addition, the CUPRAC of the extract increased significantly by increasing microwave power, extraction time, and solvent volume, as opposed to sample weight. In conclusion, microwave-assisted extraction can be suggested as a suitable method for extracting bioactive compounds from the bitter orange seed cotyledon.