

مقایسه ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد اکسایشی اسانس پوست پرتقال استخراج شده به دو روش سیال فوق بحرانی و تقطیر با آب

بهاره دهقان^۱، رضا اسماعیل زاده کناری^{۲*}، زینب رفتنی امیری^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۰۲)

چکیده

در این پژوهش تاثیر دو روش استخراج نوین (سیال فوق بحرانی) و استخراج سنتی (تقطیر با آب) بر عملکرد، ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد اکسایشی اسانس پوست پرتقال مورد مطالعه قرار گرفت. زمان کل فرآیند در روش سنتی طولانی تر از روش نوین بود. به طور کلی بازده اسانس حاصل از روش سیال فوق بحرانی (۸۳ درصد) بیشتر از روش تقطیر با آب (۲/۵ درصد) بود. ترکیبات شیمیایی اسانس حاصل به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی، شناسایی و درصد ترکیبات اندازه گیری شد. طبق نتایج بدست آمده، دی لیمونن که ترکیب اصلی موجود در اسانس پوست پرتقال می باشد در هر دو روش بیشترین مقدار را نسبت به سایر ترکیبات موجود در اسانس به خود اختصاص داد اما مقدار دی لیمونن در روش استخراج با تقطیر (۸۶/۵۸ درصد) که بیش تر از روش سیال فوق بحرانی (۶۹/۷۱ درصد) بود. ولیکن، مقدار فنول در اسانس حاصل از سیال فوق بحرانی (۱/۴۹ درصد) بیش تر از تقطیر (۰/۰۳ درصد) بود که مطابق با مقایسه فنول در آزمون فولین سیوکالتو بود. سپس فعالیت ضد اکسایشی اسانس با روش های مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاء کنندگی مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت اسانس حاصل از سیال فوق بحرانی در هر دو روش، فعالیت ضد اکسایشی بالاتری را نسبت به روش تقطیر با آب از خود نشان داد. به عبارتی کمترین مقدار IC_{50} (بیشترین فعالیت ضد اکسایشی) برابر با $35/98 \text{ mg/ml}$ در روش DPPH مربوط به روش استخراج با سیال فوق بحرانی بود.

کلید واژگان: اسانس پوست پرتقال، سیال فوق بحرانی، تقطیر با آب، فعالیت ضد اکسایشی.

۱- مقدمه

یا تخریب حرارتی می‌باشد [۱۳]. روش تقطیر بر این اصل استوار است: ابتدا اسانس تحت تاثیر حرارت به بخار تبدیل شده و سپس بخار متراکم شده، سرد شده و تبدیل به مایع می‌شود. مزیت این روش، ساده و آسان بودن آن می‌باشد. در مقایسه با تمام روش‌های ذکر شده، امروزه تمایل به روش استخراج سیال فوق بحرانی به خاطر ویژگی‌های زیر افزایش پیدا کرده است: (۱) سیالات فوق بحرانی حلالیت بالایی را ایجاد می‌کنند و در نتیجه باعث افزایش انتقال جرم می‌شوند (۲) قدرت حل‌کنندگی حلال با تغییر دما و فشار تغییر می‌کند، بنابراین با تغییر و تنظیم این دو شاخص، ترکیبات را به دلخواه و انتخابی استخراج می‌کنند. عمدتاً دی‌اکسید کربن به عنوان سیال فوق بحرانی استفاده می‌شود به دلیل آنکه حلالی ارزان، بی‌خطر، غیرقابل احتراق، بی‌بو، بی‌رنگ، بی‌مزه و غیر سمی بوده و به راحتی در دسترس می‌باشد [۱۶-۱۴].

با توجه به اینکه در ایران سالانه، نیمی از تولید مرکبات به عنوان ضایعات که عمدتاً شامل پوست هستند از خط تولید خارج می‌شوند و با توجه به اینکه صنایع فرآوری و تبدیلی مواد غذایی در جست و جوی راهی برای تولید محصولی با ارزش افزوده از پسماندهای پایین دستی خود هستند لذا شناسایی روش‌های استخراج با کارایی بالا و استاندارد سازی آن‌ها یکی از مهم‌ترین گام‌ها برای حصول این هدف می‌باشد. در نتیجه هدف از این تحقیق، تاثیر دو روش استخراج سیال فوق بحرانی و تقطیر با آب بر روی بازده، زمان استخراج و ترکیبات شیمیایی، میزان فنل کل و خاصیت ضد اکسایشی می‌باشد.

۲- مواد و روش

۲-۱- آماده سازی نمونه

میوه پرتقال از باغات مرکزی مازندران فراهم گردید. این پرتقال‌ها پس از شست و شو و پوست گیری، قسمت دارای اسانس^۱، از قسمت سفید رنگ فاقد اسانس^۲، جدا و برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت و سپس پوست پرتقال در هوای آزاد با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و به دور از نور خورشید خشک شده

پرتقال (Citrus Sinesis) از خانواده (Rutaceae) و زیرخانواده (Auratiode) می‌باشد. مطابق آمار رسمی، پرتقال فراوانترین میوه کشت شده در جهان است. در سال ۲۰۱۰ بیش از ۶۸ میلیون تن پرتقال در جهان تولید شد [۱]. مرکز آمار ایران، تولید محصول پرتقال را در سال ۱۳۹۳، ۱ میلیون و ۵۳۰ هزار تن تخمین زده است. از طرفی طی استفاده از پرتقال در صنعت، بعنوان مثال تولید آب پرتقال، تنها حدود نیمی از وزن تر پرتقال به آب میوه تبدیل شده و مقدار زیادی پسماند (پوست، پالپ، دانه و تمام میوه‌هایی که کیفیت مورد نیاز برای فرآوری را نداشتند) تولید می‌شود. یکی از گزینه‌ها به منظور بهبود مدیریت این پسماندها اجرای فرآیندهای جدید برای بازیابی آنها به عنوان مثال، از طریق تولید کودآلی، پکتین، روغن زیستی، روغن‌های ضروری و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [۳-۱]. اسانس مرکبات به عنوان مخلوطی از ترکیبات زیادی از جمله ترپن‌ها، سسکویی ترپن‌ها، آلدئیدها، الکل‌ها و استرها شناخته شده است و همچنین می‌تواند به عنوان مخلوطی از ترپن هیدروکربن‌ها، ترکیبات اکسیژنه و باقیمانده ترکیبات غیر فرار، تعریف شود [۴]. تحقیقات مختلف نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان و میوه‌ها به ترکیبات فنلی موجود در آن‌ها بستگی دارد [۵، ۶]. در پوست مرکبات ترکیبات فنلی وجود دارد [۷]. قبل از شناسایی و استفاده از روغن‌های اسانسی، باید به طریقی اسانس‌ها را بازیابی کرد که برای استخراج اسانس‌ها روش‌های متعددی وجود دارد از جمله روش‌های استخراج که برای اسانس‌گیری از پوست پرتقال مورد بررسی قرار گرفت، روش‌های سنتی از جمله، استخراج با حلال [۴]، تقطیر با بخار [۸]، تقطیر با آب [۹]، پرس سرد [۱۰] و روش‌های نوین از جمله، استخراج با سیال فوق بحرانی [۱۱]، فراصوت [۹] و مایکروویو [۸، ۹] را می‌توان اشاره کرد. که در بین این روش‌های مختلف، روش پرس سرد و تقطیر برای استخراج اسانس از پوست مرکبات رایج‌تر می‌باشد [۱۲]. با این حال محدودیت‌های زیست محیطی، مقررات بهداشت عمومی و تقاضای مصرف‌کنندگان باعث توسعه تکنولوژی‌های تمیز شده است از طرفی حضور ترکیبات حساس به حرارت نیاز به استفاده از تکنیک‌های در دمای پایین برای جلوگیری از امکان هیدرولیز و

1 Flavedo
2 Albedo

می‌باشد مورد استفاده قرار گرفت. برنامه ریزی حرارتی از ۵۰ تا ۲۷۰ درجه سانتی گراد با افزایش دمای ۳ درجه سانتی گراد در دقیقه بود. درجه حرارت محفظه تریق ۲۸۰ درجه سانتی گراد و درجه حرارت ترانسفرلاین ۲۹۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با درجه خلوص بالا مورد استفاده قرار گرفت. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از شاخص‌های بازداری^۵ و بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آن‌ها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های رایانه‌ای و مراجع معتبر صورت گرفت [۲۰].

۲-۵- اندازه گیری فنل

محتوای فنل کل اسانس پوست پرتقال از طریق رنگ سنجی به روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد. ابتدا محلول یک میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس در اتانول تهیه و سپس ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه را با ۱۱۸۵ میکرولیتر آب مقطر و ۷۵ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو^۶ مخلوط کرده و به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد ۲۲۵ میکرولیتر سدیم کربنات ۲۰٪ به محلول اضافه شد. پس از تکان دادن محلول موردنظر، مخلوط حاصل برای انجام واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. در پایان جذب نوری نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer T80+ UV/VIS) در ۷۶۰ نانومتر خوانده و به صورت میلی گرم گالیک اسید در گرم اسانس بیان شد [۲۱].

۲-۶- ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی به روش

DPPH^۷

در این بررسی فعالیت ضد رادیکالی اسانس مورد مطالعه، با استفاده از رادیکال‌های پایدار DPPH مطابق با روش ابراهیم زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت. ۲ میلی لیتر از اسانس با غلظت‌های مختلف را با ۲ میلی لیتر محلول متانولی (۱۰۰ میکرومولار) DPPH مخلوط گردید. برای شاهد نیز ۲ میلی لیتر

و با آسیاب کاملاً پودر شد. نمونه‌ها پس از آسیاب در بسته‌های نایلونی به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت بسته بندی و تا زمان انجام آزمایش در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد قرار گرفت [۱۷].

۲-۲- تقطیر با آب (HD)^۳

برای این منظور ۱۰۰ گرم از پودر پوست پرتقال خشک شده را درون بالن ریخته و بعد به آن آب مقطر اضافه شد تا حدی که سطح پودر نمونه را کاملاً پوشاند. استخراج در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد (دمای جوش آب) و به مدت ۴ ساعت (تازمانیکه کلیه اسانس از نمونه خارج شود) انجام شد، سپس اسانس حاصل تا زمان آنالیز، در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۸].

۲-۳- سیال فوق بحرانی (SCF)^۴

برای استخراج اسانس با روش سیال فوق بحرانی از سیستم چند منظوره Suprex MPS/225, ساخت کشور آمریکا (Pittsburg, USA) استفاده شد. برای این منظور ۲۰ گرم پودر پوست پرتقال با ۱۰۰ میلی لیتر حلال کمکی اتانول مخلوط و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و فشار ۱۰۰ بار و مدت زمان ۳۰ دقیقه اسانس گیری شد، نرخ جریان سیال فوق بحرانی CO₂ نیز ۱ ml/min بود. سپس مخلوط مورد نظر فیلتر و حلال موجود در آن تبخیر شد و اسانس حاصل تا زمان آنالیز، در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۹].

۲-۴- اندازه گیری ترکیبات شیمیایی اسانس

پرتقال توسط کروماتوگرافی گازی-جرمی

برای آنالیز اسانس، دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent Technologies 7890A, ساخت کشور آمریکا) و طیف سنج جرمی (مدل Agilent Technologies 5975C, ساخت کشور آمریکا) با ستون دستگاه (Agilent Technologies Inc. HP-5MS, ساخت کشور آمریکا) که از نوع موبینه با طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر که لایه فاز ساکن در آن ۰/۲۵ میکرون

5. Retention time
6. Folin Ciocalteu
7. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

3. Hydro Distillation
4. Supercritical fluid

spss نسخه ۱۹ و توسط طرح کامل تصادفی و آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. مقایسه میانگین‌های حاصل از سه تکرار، توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۹ درصد انجام پذیرفت.

۳- نتایج

۳-۱- بازده استخراج

خصوصیات فیزیکی و بازده اسانس پوست پرتقال حاصل از دو روش مختلف استخراج در جدول ۱ مشاهده می‌گردد. زمان استخراج با سیال فوق بحرانی (۰/۵ ساعت) کمتر از روش تقطیر با آب (۴ ساعت) بود ولی بازده اسانس گیری در روش سیال فوق بحرانی (۸۳٪) بیشتر از روش تقطیر با آب (۲/۵٪) بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$). در نتیجه سیال فوق بحرانی از این نظر عملکرد بهتری را نسبت به روش تقطیر با آب از خود نشان داد. اسانس حاصل از SCF نسبت به HD آرومای تندتر و بیشتری داشت و ویسکوزتر بود، که شاید علت قوام آن این است که علاوه بر اسانس، موم و چربی و رزین نیز در SCF استخراج می‌شود. به عبارتی در روش سیال فوق بحرانی ترکیبات با وزن مولکولی بالا از جمله استرها، اسیدهای چرب و ترکیبات مومی شکل استخراج می‌شوند در حالی که در روش تقطیر ترکیبات با فراریت بیشتر استخراج می‌شود. در نتیجه اسانس حاصل از HD رقیق تر بوده و شفاف می‌باشد.

متانول خالص با ۲ میلی لیتر محلول DPPH مخلوط گردید. برای صفر کردن دستگاه هم از متانول خالص استفاده شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی و در دمای محیط، جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و در نهایت غلظتی از اسانس که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰ درصد بود یا (IC_{50}) توسط نمودار محاسبه گردید. بدیهی است هر چه این عدد کوچکتر باشد قدرت آنتی اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می‌باشد [۲۲].

۲-۷- ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی به روش

قدرت احیا کنندگی

میزان فعالیت ضد اکسایشی به روش اسماعیل زاده کناری و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت. ۲/۵ میلی لیتر از اسانس با غلظت‌های مختلف را با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH برابر با ۶/۶ و ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۵ میلی لیتر از قسمت بالای محلول با ۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد [۲۳].

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم افزار

Table 1. Characteristic of the orange peel oil obtained by two different methods

Extraction methods	Time (h)	Yield (%v/w)	texture	colour
SCF	0.5 ^b	8/3 ^a	liquid fluid and Little Viscose	colourless
HD	4 ^a	2/5 ^b	liquid fluid and clear	colourless

Different letters within the same column indicate significant differences ($P < 0.01$).

(۸۶/۵۸٪) بیشتر از روش SCF (۶۹/۷۱٪) بود. ولی مقدار فنول در SCF (۱/۴۹٪) بیشتر از HD (۰/۰۳٪) می‌باشد.

Table 3 Chemical compounds of orange peel essential oil is extracted by Hydrodistillation

compound	Rt(min)	%
Monoterpene Hydrocarbons		
alpha.- Pinene	5.99	1.06
Camphene	6.42	0.01
Sabinene	7.21	1.21
beta.-Myrcene	7.83	2.36
D-Limonene	9.67	86.58
DELTA. 3 CARENE	10.11	0.42
ALPHA.-TERPINOLENE	11.52	0.14
gamma.-Terpinene	15.24	0.17
BETA.-PINENE	17.66	0.08
Oxygenated Monoterpene Hydrocarbons		
Octanal	7.83	2.36
1-Octanol	11.00	0.22
Linalool	12.09	2.05
CITRONELLAL	14.33	0.14
Decanal	16.52	0.85
Sesquiterpene hydrocarbons		
beta.-Phellandrene	15.84	0.29
2,6-Octadiena	19.42	0.29
alpha.-Cubebene	23.66	0.07
beta.-Cubebene	24.31	0.11
trans.-beta.-Farnesene	27.24	0.04
Valencene	28.49	0.14
alpha.-Farnesene	29.41	0.03
beta.-cadinene	29.77	0.07
Amine compounds		
Phenylpropanolamine	30.63	0.01
Cathine	39.96	0.01
Phenethylamine	51.57	0.01
Other compounds		
Phenol	23.17	0.03
Acetamide	36.76	0.05

۳-۴- مقایسه کلی از فعالیت ضد اکسایشی

IC_{50}^8 اسانس استخراج شده از هر دو روش بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر در جدول ۴ نشان داده شده است. در آزمون DPPH، IC_{50} بیانگر غلظتی از اسانس است که برای مهار 50 درصد رادیکال های آزاد DPPH مورد نیاز می‌باشد که کم ترین

8. half maximal inhibitory concentration

۳-۲- ترکیبات شیمیایی اسانس حاصل از دو روش مختلف با استفاده از کروماتوگرافی گازی - جرمی

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس همراه با درصد فراوانی هر جز در جدول ۲ و ۳ ارائه گردیده است.

همچنین ترکیبات الکلی (۲/۷۵٪) و آمیدی (۶/۷۶٪) و آمینی زیادی (۱۲/۸۶٪) در اسانس حاصل از SCF دیده شد.

Table 2 Chemical compounds of orange peel essential oil is extracted by Supercritical fluid

compound	Rt(min)	%
Monoterpene Hydrocarbon		
D-Limonene	9.08	69.71
Amides compounds		
Acetamide	4.23	1.01
Propanamide	47.07	5.71
Alcohols		
Thiophene-3-ol	15.68	2.40
1-Propanol	31.30	0.35
Amine compounds		
Cathine	8.58	5.76
2-Ethoxyamphetamine	12.73	2.40
Phenylpropanolamine	16.39	2.79
3-Ethoxyamphetamine	45.87	1.12
sec-Butylamine	62.83	0.79
Other compounds		
semicarbazide	5.66	0.19
Benzaldehyde	12.29	0.44
Phenol	31.46	1.49
12-Methylaminolauric acid	34.93	2.20
Dodecanoic acid	38.65	2.29

همان گونه که ملاحظه می‌شود تفاوت در روش استخراج، باعث تفاوت ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شده است. عمده ترین ترکیبات تشکیل دهنده در هر دو نمونه، مونوترپن هیدروکربنی (دی لیمونن) می‌باشد که مقدار آن در اسانس حاصل از HD

اسانس پوست پرتقال در روش سیال فوق بحرانی، کمترین IC_{50} و بالاترین قدرت احیاکنندگی را به خود اختصاص داده است و هرچند این اختلاف کم می‌باشد. از لحاظ خاصیت ضد اکسایشی، سیال فوق بحرانی عملکرد بالاتری را نسبت به روش تقطیر با آب از خود نشان داده است که این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار بود ($P \leq 0/01$).

میزان IC_{50} (بیشترین فعالیت ضد اکسایشی) برابر $35/98$ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به روش سیال فوق بحرانی و بیشترین میزان IC_{50} (کمترین فعالیت ضد اکسایشی) برابر $67/97$ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به روش تقطیر با آب می‌باشد. در آزمون قدرت احیاکنندگی منظور از IC_{50} غلظتی است که جذب اسانس به نیم برسد. با توجه به داده‌های ارائه شده در جدول زیر،

Table 4 Antioxidant activity of orange peel essential oil by two different methods

Extraction methods	Antioxidant activity (IC_{50})		Phenol (GAE mg/g)
	Reducing power (mg/ml)	DPPH (mg/ml)	
SCF	18/34 ^b	35/98 ^b	0.24 ^a
HD	18/56 ^a	67/97 ^a	0.16 ^b

Different letters within the same column indicate significant differences ($P < 0.01$).

استخراج و پس از آن ۲۱۰ دقیقه زمان برای تبخیر آب و اسانس لازم بود. Pereira و Meireles در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که هزینه تولید اسانس با روش سیال فوق بحرانی کمتر از تقطیر با آب بود، اگرچه هزینه تجهیزات SCF بالاتر از HD می‌باشد، ولی هزینه بالاتر و راندمان پایین تر و مصرف انرژی بیشتر در روش HD باعث شده که روش SCF بهتر از روش HD برای استخراج اسانس باشد [۱۳]. تحولات اخیر در فن آوری استخراج سیال فوق بحرانی نشان داده است که این روش می‌تواند جایگزین روش‌های استخراج معمولی باشد. همچنین نشان داده شده است که سیال فوق بحرانی باعث تولید اسانس با آرومای طبیعی و بدون تغییرات شیمیایی ناشی از گرما و آب، و بدون باقی مانده حلال و ترکیبات نامطلوب مانند نمک‌های آلی و غیرآلی، قند می‌شود [۳۰]. مطابق با کروماتوگرام حاصل در این تحقیق اسید چربی به نام اسید لوریک (دودکانوئیک اسید)، در اسانس حاصل از SCF دیده شده که با نتایج Khan و همکاران در سال ۲۰۱۳، مطابقت دارد [۳۱]. حضور این اسید چرب می‌تواند دلیل بر حضور موم‌ها و چربی‌ها باشد. مطابق با این نتایج، Saha و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که علت ویسکوزیته بیشتر اسانس حاصل از SCF نسبت به HD بعلت حضور موم‌ها و ترکیبات سنگین بوده، درواقع GC/MS حضور

۴- بحث

انتخاب روش مناسب اسانس گیری، می‌تواند بازده و کارایی استخراج مواد آنتی اکسیدانی موجود در گیاه را به میزان چشمگیری افزایش دهد. به طوری که بازده اسانس حاصل از روش SCF بیشتر از روش HD بود. گزارشات فراوانی، مبنی بر افزایش بازده اسانس (حاصل از گیاهان مختلف) حاصل از روش سیال فوق بحرانی نسبت به روش تقطیر با آب ارائه شده است، که نتیجه این تحقیقات با تحقیق حاضر مطابقت دارد [۲۷-۲۴، ۱۷]. دلیل کاهش راندمان در روش‌های سنتی مثل تقطیر با آب این است که با توجه به مدت زمان طولانی حرارت دادن برای رسیدن به دمای لازم جهت تبخیر ترکیبات فرار، بسیاری از این ترکیبات از دست می‌روند، ترکیبات غیر اشباع و استری تجزیه و انرژی و زمان زیادی تلف خواهد شد [۲۸]. دی اکسید کربن بهترین حلال برای ترکیبات غیر قطبی می‌باشد [۲۹]. اسانس هم ماهیت روغنی و غیر قطبی دارد که این خود کمک به افزایش بازده استخراج اسانس می‌کند. کاهش هزینه استخراج از نظر انرژی و زمان در روش SCF دیده شده است به طوری که کل زمان لازم برای عمل تبخیر اسانس در روش SCF، ۳۰ دقیقه بود، در صورتی که در روش HD، ۳۰ دقیقه زمان برای گرم کردن ۱ لیتر آب و ۱۰۰ گرم پودر پوست پرتقال برای رسیدن به دمای

اسیدهای چرب را در SCF نشان داد که دلیل بر وجود موم‌ها می‌باشد در حالی که این ترکیبات در HD وجود نداشت [۳۲]. هم چنین مطابق با نتایج تحقیق حاضر، تحقیقات فراوانی وجود دارد که گزارش کردند دی‌لیمون ترکیب عمده موجود در اسانس پرتقال می‌باشد [۳۳، ۳۴] و مقدار ترکیبات مونوترپن هیدروکربنی در اسانس HD بیشتر از SCF می‌باشد [۳۵]. طبیعت آنتی‌اکسیدانی اسانس است بعلاوه وجود دی‌لیمونن باشد که اجزای عمده اسانس می‌باشد [۳۶]. هم چنین، Fella و همکاران گزارش کردند که کامفن و میرسن در اسانس حاصل از HD دیده شد در صورتی که این ترکیبات در SCF حضور نداشت. آن‌ها همچنین گزارش کردند که ترکیبات با وزن مولکولی بالا شامل استرها، اسیدهای چرب و الکل‌ها واکس‌ها در روش SCF استخراج می‌شوند ولی ترکیبات هیدروکربنی در HD بیشتر استخراج می‌شود. ترکیبات آمینی زیادی در اسانس حاصل از SCF دیده شده است [۳۸، ۳۷]. طبق نتایج حاصل از آزمون فولین سیوکالتو و کروماتوگرام حاصل مقدار فنول در اسانس حاصل از SCF بیشتر از روش HD می‌باشد. که در نتیجه افزایش مقدار فنول خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد [۳۶]. در مقایسه روش‌های سنتی (HD) و نوین (SCF)، مطابق با آزمون DPPH و قدرت احیا کنندگی، IC₅₀ کمتر (ضد اکسایشی بیشتر) مربوط به اسانس حاصل از SCF می‌باشد که گزارشات فراوانی این نتیجه رو تایید می‌کنند [۳۵]. در واقع مطابق با نتایج تحقیق مورد نظر، مچرگویی و همکاران (۲۰۱۴)، در بررسی اسانس پونه استخراج شده به روش سیال فوق بحرانی و هیدروقطبیر گزارش کردند، بازده اسانس گیری با روش سیال فوق بحرانی (۴/۳٪) بالاتر از روش هیدروقطبیر (۲/۲٪) بود و مقدار IC₅₀ اسانس حاصل از SCF (۴۴/۰۲ mg/l) کمتر از روش HD (۱۰۵/۲۹ mg/l) بود در نتیجه فعالیت ضد اکسایشی اسانس حاصل از سیال فوق بحرانی در روش DPPH بالاتر از روش هیدروقطبیر بود [۳۹]. و هم چنین دانه و همکاران (۲۰۱۳)، در مقایسه ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد اکسایشی اسانس اسطوخودوس استخراج شده به روش سیال فوق بحرانی و هیدروقطبیر به این نتیجه رسیدند که بازده اسانس در روش سیال فوق بحرانی (۶/۶۸٪) بیشتر از روش هیدروقطبیر (۴/۵۷٪) بود و همچنین در بررسی فعالیت ضد

اکسایشی اسانس با روش DPPH نتایج نشان داد که درصد مهار رادیکال اسانس حاصل از سیال فوق بحرانی (۶۳٪) بیشتر از روش هیدروقطبیر (۴۸٪) بود [۳۰]. ولی با نتایج حاصل از Saha و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تضاد می‌باشد، هر چند Saha و همکاران در بررسی مقایسه اسانس زیره سبز استخراج شده به روش سیال فوق بحرانی و هیدروقطبیر به این نتیجه رسیدند که بازده اسانس گیری و زمان استخراج در روش سیال فوق بحرانی به ترتیب برابر با ۱/۷۱٪ و نیم ساعت و در روش هیدروقطبیر برابر با ۰/۷۲٪ و ۳ ساعت بود که در تطابق با نتیجه تحقیق حاضر بود، ولی نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار فنل با روش فولین سیوکالتو نشان داد که مقدار فنل اسانس حاصل از روش هیدروقطبیر بیشتر از روش سیال فوق بحرانی بوده، در نتیجه در ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی اسانس به روش DPPH و FRAP اسانس حاصل از هیدروقطبیر نسبت به روش سیال فوق بحرانی فعالیت ضد اکسایشی بالاتری را از خود نشان داد که در تضاد با نتیجه تحقیق حاضر بود [۳۲]. که علت این تفاوت می‌تواند شرایط استخراج استفاده شده باشد. اگرچه دی‌اکسید کربن میل ترکیبی قوی به چربی‌ها و میل ضعیفی به اکسیژن دارد ولی با استفاده از حلال‌های کمکی مثل اتانول و متانول می‌توان ترکیبات اکسیژنه بیشتری را استخراج کرد. پس به نوع و مقدار حلال کمکی بستگی دارد و همچنین در روش SCF با افزایش فشار در یک دمای معین، قدرت حلال دی‌اکسید کربن برای استخراج ترکیبات قطبی با کمک حلال‌های کمکی بیشتر می‌شود پس به شرایط بهینه استخراج SCF بستگی دارد. علت بیشتر بودن فعالیت ضد اکسایشی اسانس پوست پرتقال حاصل از SCF علاوه بر حضور بیشتر فنول به دلیل وجود فراوان ترکیبات دارای گروه‌های آمین نیز می‌باشد که در نتایج حاصل از کروماتوگراف دیده شده است حال آن که مقدار این ترکیبات در اسانس حاصل از HD به مقدار خیلی جزئی می‌باشد. گزارشاتی فراوانی مبنی بر خاصیت ضد اکسایشی ترکیبات آمینی وجود دارد [۴۰-۴۳].

۵- نتیجه گیری

در این تحقیق مقایسه روش‌های سنتی و نوین اسانس گیری نشان داد، اسانس حاصل از روش سیال فوق بحرانی بیشترین مقدار

- supercritical CO₂ and cosolvents. Food and bioproducts processing, 1-10.
- [8] Kusuma, H.S, Putra, AFP and Mahfud, M, 2016, Comparison of Two Isolation Methods for Essential Oils from Orange Peel (*Citrus auranticum* L) as a Growth Promoter for Fish: Microwave Steam Distillation and Conventional Steam Distillation, *Journal of Aquaculture*, 1-5.
- [9] Boukroufa, M, Boutekedjiret, C, Petigny, L, Rakotomanomana, N, Chemat, F, 2014, Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin, *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 72-79 .
- [10] Menichinia, F, Tundisa, R, Bonesia, M, Cindiob, B, Loizzoa, M.R, Confortia, F, Stattia, Roberta Menabenic, G.A, Bettinic, R, and Menichinia, F, 2011, Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, old-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. Taylor & Fran Group, 789-799.
- [11] Berna a, A, Ta'rrega, A, Blasco, M, b, Subirats, S, 2000, Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed, *Journal of Supercritical Fluids*, 18, 227-237 .
- [12] Atti-Santos, A.C, Rossato, M, Serafini, L.A, Cassel, E, Moyna, P, 2005, Extraction of sstantial Oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide, *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*, 155-160 .
- [13] Pereira, C.G and Meireles, M.A, 2007, Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction, *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, 22, 407-413.
- [14] Khajeh, M, Yamini, Y, Bahramifar, N, Sefidkon, F, Pirmoradei, M.R, 2005, Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods, *Food Chemistry*, 91, 639-644.
- [15] Golmakani, MT, Rezaei, K, 2008, Comparison of microwave-assisted فنل کل و بالاترین خاصیت ضد اکسایشی و بیشترین بازده را نسبت به روش تقطیر با آب دارد. از طرفی روش سیال فوق بحرانی سریع بوده و مصرف انرژی و آلودگی محیط زیست پایینی دارد در نتیجه برای اسانس گیری پیشنهاد می‌شود. بنابراین با توجه به تولید زیاد محصول پرتقال و از طرفی تولید پسماند زیاد در نتیجه مصارف صنعتی از پرتقال، و با توجه به خاصیت ضد اکسایشی و آنتی میکروبی آن، می‌توان برای مصارف خوراکی و دارویی بهره جست.

۶- منابع

- [1] Calabrò, P.S, Pontoni, L, Porqueddu, I, Greco, R, Pirozzi, F, Malpe, F, 2015, Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization, Preliminary batch results. *Waste Management*, 48, 440-447
- [2] Martin, M.A, Siles, J.A, Chica, A.F, Martin, A, 2010, Biomethanization of orange peel waste, *Bioresour. Technol*, 101, 8993-8999.
- [3] Allaf, T, Tomao, V, Besombes, C, Chemat, F, 2013, Thermal and mechanical intensification of essential oil extraction from orange peel via instant autovaporization. *Chemical Engineering and Processing*, 72 :24-30 .
- [4] Gonçalves, D, Teschke, M.E.E, Koshima, C.C, Gonçalves, C.B, Oliveira, A.L, Rodrigues, C.E.C, 2015, Fractionation of orange essential oil using liquid-liquid extraction: Equilibrium data for model and real systems at 298.2 K. *Fluid Phase Equilibria* 399, 87-97.
- [5] Yasri, S, Yasari, E, 2013, Investigation of antioxidant features of Thompson orange peels as a natural antioxidant. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(18), 2207-2215.
- [6] Jayaprakasha, G.K, Girenavar, B, Patil, B.S, 2008, Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresour. Technol*, 99 (10), 4484 - 4494.
- [7] Espinosa-Pardo, F.A, Nakajimab, V.M, AlvesMacedob, G, Macedob, J.A, Martíneza, J, 2016, Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using

- ultrasound-assisted extraction methods. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 426–435.
- [24] Rezazadeh, Sh, Baha-aldini B.Z.B.F, Vatanara, A, Behbahani, B, Rouholamini Najafabadi, A, Maleky-Doozzadeh, M, Yarigar-Ravesh, M, Piralı amedani, M, 2008, Comparison of Super Critical Fluid Extraction and Hydrodistillation Methods on Lavander's Essential Oil Composition and Yield, *Journal of Medicinal Plants*, 7(4), 63-68 .
- [25] Khajeha, M, Yaminib, Y, Shariatic, S, 2010, Comparison of essential oils compositions of *Nepeta persica* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation ethods, *food and bioproducts processing* , 88, 227–232 .
- [26] Ouzzara, M.L., Louaera, W., Zemanea, A., Meniai, A.H., 2015, Comparison of the Performances of Hydrodistillation and Supercritical CO₂ Extraction Processes for Essential Oil Extraction from Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.), *CHEMICAL ENGINEERINGTRANSACTIONS*, 43: 1129-1134.
- [27] Yamini , Y, Khajeh ,M, Ghasemi, E, Mirza, M, Javidnia, K, Comparison of essential oil omissions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods, 2008, *Food Chemistry* 108, 341–346 .
- [28] Aberoomand Azar, P, Mottaghianpuor ,Z, Sharifan, A, Larijani, K, 2010, Studies on the Effect of Extraction Method on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Carum copticum* Essential Oil, *Food Technology & Nutrition*, 7(2), 10-18.
- [29] Pourmortazavi, S.M, Hajimirsadeghi, S.S, 2007, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *Journal of Chromatography A*, 1163, 2–24.
- [30] Danh, L.T, Han, L.N, Anh Triet, N.D, Zhao, J, Mammucari, R, Foster, N, 2013, Comparison of Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) Essential Oils Extracted by Supercritical CO₂, Hexane and Hydrodistillation, *Food Bioprocess Technol* 6, 3481–3489.
- [31] Ali Khan, F, Abdeltawab , A.A, Al-Deyab2, S.S, Ali, J, Ullah, R, Nasimullah Qureshi, M, Ziaurrahman, Siddique, M, Ullah, hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem*, 109(4), 925-30.
- [16] Gupta, D, Shah, M., Shrivastav, P, 2013, Microwave-Assisted Extraction of *Eucalyptus itriodora* Oil and Comparison with Conventional Hydro Distillation. *Middle-East. J Sci Res.* 16(5), 702-5.
- [17] Atti-Santos, A.C, Rossato, M, Serafini, L.A, Cassel,E, Moyna, P, 2005, Extraction of Essential Oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 155-160.
- [18] Nikkhah, F, Sefidkon,F, Sharifi Ashoorabadi, E, 2009, The effect of distillation methods and plant growth stages on the essential oil content and composition of *Thymus vulgaris* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25(3), 309-320.
- [19] Luengthanaphol, S, D. Mongkholkhajornsilp, S, Douglas, P. L, Douglas, L, Pongsopa, I, and Pongamphai, S, 2004. Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat - preliminary experiments. *J. Food Eng.* 63, 247-252.
- [20] Mirza1,M and Baher Nik,Z, 2006, The Role of Deterpination on the Essential Oil Composition of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 22(3), 250-255.
- [21] Asikn, Y, Taira,I.K., Inafuku, S.A, Umi, H.S, Sawamura, M, Takara, K, Wada, K, 2012, Volatile Aroma Components and Antioxidant Activities of the Flaveo Peel Extract of Unripe *Shiikuwasha* (*Citrus depressa* Hayata). *journal of Food Science*, 77 (4), 469-475.
- [22] Ebrahimzadeh, M.A, Nabavi, S.M, Nabavi,S.F, Bahramian, F, Bekhradnia, A.R, 2010, ANTIOXIDANT AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF *H. OFFICINALIS* L. VAR. *ANGUSTIFOLIUS*, *V. ODORATA*, *B. HYRCANA* AND *C. SPECIOSUM*, *Pak. J. Pharm*, 23(1): 29-34.
- [23] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Raftani Amiri, Z., 2014, Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and

- South Africa. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(6), 1373 – 1377.
- [38] Zandpour, F, Vahabi, M.R, Allafchian, A.R, Farhang, H.R, 2016, Phytochemical investigation of the essential oil from the and stem of *dorema ammoniacum* D.Don (Apiaceae) in Central Zagros, Iran. *Journal of Herbal Drug*, 7(2): 109-116.
- [39] Mechergui, K, Jaouadi, W, Coelho, J.P, Serra, M.C, Marques, A.V, Palavra, A.M.F, Khouja, M.L, oukhchina,S, 2014, Chemical composition and antioxidant activity of Tunisian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and volatile oil obtain by supercritical CO₂ extraction, *International Journal of Advanced Research* 2(12), 337-343.
- [40] SON, S, AND LEWIS, B.A, 2002, Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 50, 468-472.
- [41] MARINOVA, E, GEORGIEV, L.,TOTSEVA, I, SEIZOVA, K, 2013, Antioxidant Activity and Mechanism of Action of Some Synthesised Phenolic Acid Amides of Aromatic Amines. *Czech J. Food Sci*,1, 5–13.
- [42] Bendary, E, Francis, R.R, Ali, H.M.G, Sarwat, M.I, El Hady, S, 2013, Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Science* 58(2), 173–181.
- [43] Ley, J.P, 2001, Phenolic acid amides of phenolic benzylamines against UVA-induced oxidative stress in skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 23, 35-48.
- N, 2013, Comparative Evaluation of Physiochemical and GC-MS Analysis of Sour Oranges and Sweet Oranges Peels Oil. *Life Science Journal* 10(10), 205-209.
- [32] Saha, S, Walia, S, Kundu, A, Sharma, K, Singh, J, Tripathi, B and Raina, A, 2016, Compositional and functional difference in cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil extracted by hydrodistillation and SCFE. *FOOD SCIENCE & TECHNOLOG*, 1-9.
- [33] Njoku, V.I, Evbuomwan, B.O, 2014, Analysis and Comparative Study of Essential Oil Extracted from Nigerian Orange, Lemon and Lime Peels, *Greener Journal of Chemical Science and Technology*, Vol, 1 (1), pp. 006-014.
- [34] Khan, M.M, Iqbal, M, Hanif, M.A, Mahmood, M.S, Naqvi, S.A, Shahid, M, Jaskani, M.J, 2012, Antioxidant and Antipathogenic Activities of Citrus Peel Oils, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15 (6), 972 – 979.
- [35] Bagheri, H, Manap, M.Y.B.A, Solati, Z, 2014, Antioxidant activity of Piper nigrum L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. *Talanta* 121, 220–228.
- [36] Junior, M.R.M, Rocha e Silva, T.A.A, Franchi, G.C, Nowill, A, Pastore, G.M, Hyslop, S, 2009, Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chem.* 116, 8–12.
- [37] Chalannavar, R.K, Venugopala, K.N, Baijnath, H, Odhav.B, 2015, Chemical Composition of Essential Oil from the Seed Arils of *Strelitzia nicolai* Regel & Koern from

Comparison of chemical composition and antioxidant activity of essential oils of orange peel in two ways supercritical fluid extraction and hydro distillation

Dehghan, B. ¹, Esmaeilzadeh Kenari, R. ^{2*}, Raftani Amiri, Z. ²

1. Master student of food science and technology, sari agricultural sciences and natural resources university

2. Associated Professor, Department of Food Science and Technology, sari agricultural sciences and natural resources university

(Received: 2017/02/25 Accepted: 2017/06/23)

In this research, the effect of two methods of namely extraction (supercritical fluid) and traditional extraction (distillation with water) on the yield, chemical composition and antioxidant activity of essential oil of orange peel were studied. The whole process in the traditional method took longer than the new method and generally the yields of obtained essential oil by supercritical fluids (8.3%) was more than water distillation method (2.5%) respectively and chemical composition of essential oils was identified and the percentage of compounds was measured using gas chromatography- mass spectrometry. According to the results of chromatography, D-limonene which is the main composition of essential oil of orange peel had the highest frequency in both methods compared to the other components of the essential oil. But the amount of D-limonene in extractions by distillation method (86.58%) was more than supercritical fluids method (69.71%) respectively. However, according to the chromatogram, the amount of phenol in the essential oil of supercritical fluids (1.49%) was more than distillation method (0.03%), which is in accordance with the phenol comparison in the Folin-Ciocalteu test. Then the antioxidant activity of essential oils was evaluated using DPPH free radical scavenging methods and reducing ability. Finally, essential oil of supercritical fluids, showed a higher antioxidant activity than water distillation. In other words, the lowest IC₅₀ (the highest antioxidant activity) is equal to 35.98 mg/ml in DPPH method of supercritical fluid extraction method.

Key words: Essential oils of orange peel, Supercritical fluid, Hydro distillation, Antioxidant activity.

* Corresponding author E-Mail Address: reza_kenari@yahoo.com