

بررسی مقایسه‌ای روش استخراج به کمک نفوذ خشک مایکروویو و گرانش بر کیفیت اسانس رزماری

احسان شاد^۱، هادی هاشمی گهروئی^۱، محمد تقی گل‌مکانی^{۲*}، سارا مزیدی^۱

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

* نویسنده مسئول (golmakani@shirazu.ac.ir)

چکیده

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۱۸

واژه‌های کلیدی

اسانس

استخراج

رزماری

مایکروویو

روش نفوذ خشک مایکروویو و گرانش یکی از پیشرفته‌ترین روش‌های استخراج به کمک مایکروویو است. هدف از این پژوهش، مقایسه روش استخراج نفوذ خشک مایکروویو و گرانش با روش‌های تقطیر با آب به کمک مایکروویو و تقطیر با آب بر کیفیت اسانس رزماری بود. متغیرهایی چون بازدهی نهایی استخراج، زمان استخراج، ترکیبات شیمیایی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و میزان انرژی مصرفی مقایسه شدند. نتایج این پژوهش نشان داد زمان کل فرایند در روش‌های استخراج اسانس به کمک نفوذ خشک مایکروویو و گرانش، تقطیر با آب به کمک مایکروویو و تقطیر با آب به ترتیب ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه و مصرف انرژی آنها به ترتیب ۰/۰۴، ۰/۱۳ و ۱/۰۰ کیلووات‌ساعت بود. روش استخراج اسانس به کمک نفوذ خشک مایکروویو و گرانش مزایای مهمی از جمله، افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی (۱۰/۳ درصد) و تولید اسانس با ارزش‌تر (آلفا پینن، کامفن و ۱-۸-سینئول هر کدام به ترتیب ۱۷/۰، ۲/۱ و ۲/۸ درصد بیشتر) را نسبت به روش تقطیر با آب دارد. تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنج جرمی اسانس-های استخراج شده نشان داد که استفاده از امواج مایکروویو تأثیر مهمی روی ترکیب اسانس‌ها ندارد. روش استخراج نفوذ خشک مایکروویو و گرانش نسبت به روش‌های تقطیر با آب به کمک مایکروویو و تقطیر با آب نیاز به انرژی، هزینه و حلال کمتری داشته و به همین دلیل جزء فن‌آوری‌های دوست‌دار محیط زیست شناخته می‌شود.

مقدمه

میکروویو مناسب به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی مطرح می‌باشد (Wang et al., 2008). مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس رزماری آلفا-پینن، ۱ و ۸-سینئول و کامفور بوده که مقادیر آنها در استخراج با روش‌های گوناگون متفاوت می‌باشد (Boutekedjiret et al., 2003). استخراج ترکیبات به کمک روش‌های متداول به کمک فرآیندهای مختلفی نظیر خرد کردن مکانیکی، فشار دادن و یا حرارت انجام می‌پذیرد اما این روش‌ها به دلیل طولانی بودن زمان فرایند، مصرف بالای انرژی، تولید مقدار زیادی گرما و تخریب ترکیبات حساس کارآمد نمی‌باشند. بدین

رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) گیاهی از خانواده نعناعیان می‌باشد. این گیاه همیشه سبز و معطر بوده و در کشورهای نواحی غربی دریای مدیترانه و همچنین در برخی از مناطق ایران کشت می‌گردد. تولیدکنندگان اصلی این گیاه کشورهای ایتالیا، اسپانیا، یونان، ترکیه، فرانسه، پرتغال و همچنین کشورهای شمال آفریقا می‌باشند. اسانس رزماری به عنوان طعم-دهنده طبیعی در مواد غذایی استفاده می‌شود. این اسانس به دلیل خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد-

های مرسوم تقطیر با آب (HD^۲) و تقطیر با آب به کمک مایکروویو (MAHD^۳) به عنوان روش‌های معمول و تجاری در استخراج اسانس مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد

در این پژوهش گیاه تازه رزماری از شهر شیراز (۲۹ درجه و ۳۶ دقیقه شمالی و ۵۲ درجه و ۳۲ دقیقه شرقی)، استان فارس تهیه و جنس و گونه آن توسط متخصصین هرباریوم بخش زیست‌شناسی دانشگاه شیراز تایید گردید. اندازه‌گیری میزان رطوبت بر اساس روش استاندارد (AOCS) و در آن الکتریکی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد (American Oil Chemist' Society, 1993). متان و هگزان درجه کروماتوگرافی و DPPH^۴ از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

روش استخراج

طراحی و ساخت دستگاه MDG

دستگاه استخراج اسانس به روش نفوذ خشک مایکروویو و گرانش در آزمایشگاه بخش علوم و صنایع غذایی دانشگاه شیراز طراحی و ساخته شد (شکل ۱-الف). در طراحی این دستگاه از یک آون مایکروویو ۲/۴۵ گیگا هرتز (ME6194SD، سامسونگ، مالزی) با حداکثر توان ۱۰۰۰ وات استفاده شد. زمان و توان دستگاه توسط نرم‌افزار قابل کنترل بود. ظرف استخراج از جنس پیرکس و با حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر در آزمایشگاه شیمی دانشگاه شیراز طراحی و ساخته شد. روش MDG در فشار اتمسفر کار می‌کند و در آن از گیاه تازه در توان ثابت بدون اضافه کردن آب استفاده می‌شود. در این روش آب ساختاری در آزادسازی ترکیبات فرار از سلول‌های گیاهی نقش مؤثری دارد. این ترکیبات معمولاً به کمک انتشار همراه با آب داغ و یا عصاره خام از گیاه استخراج و به کمک نیروی جاذبه زمین به کندانسور پایین دستگاه انتقال داده

منظور در سال‌های اخیر روش‌های استخراج نوینی با رویکرد توسعه روش‌هایی بسیار کارآمد برای کاهش مصرف انرژی مورد توجه قرار گرفته که از آن جمله می‌توان به روش استخراج به کمک امواج مایکروویو اشاره کرد. پیشرفت‌های متفاوتی در زمینه روش‌های استخراج با امواج مایکروویو مانند استخراج با حلال به کمک امواج مایکروویو (Metaxas & Meredith, 1983; Lane & Jenkins, 1984; Paré, 1992 Paré et al., 1991; Paré et al., 1990)، تقطیر با آب مایکروویو (Paré & Bélanger, 1997; Pare, 1994)، استخراج با فشار هوا به کمک امواج مایکروویو (Eskilsson & Björklund, 2000) و استخراج به کمک امواج مایکروویو بدون حلال (Luque-Garcia & De Castro, 2004; Craveiro et al., 1989) و استخراج به کمک نفوذ خشک مایکروویو و گرانش (MDG^۱) انجام شده است. روش استخراج MDG به دلیل عدم استفاده از حلال‌ها و کاهش مصرف انرژی به دلیل زمان کوتاه فرآیند، جزء فناوری‌های دوست‌دار محیط زیست قرار دارد. اساس کار این روش بر پایه سیستم حرارت‌دهی امواج مایکروویو (هر سه سیستم حرارت‌دهی هدایت، جابجایی و تشعشع به‌طور هم-زمان) و نیروی جاذبه زمین در فشار اتمسفری می-باشد. امواج مایکروویو به دلیل افزایش سریع دما و تخریب گویچه‌های حاوی اسانس در مدت زمان بسیار کوتاهی سبب آزادسازی اسانس می‌گردد (Vian et al., 2008). بر خلاف سیستم‌های معمول که اسانس‌ها بر اساس فراریت جدا می‌گردند، در این روش به دلیل طراحی خاص دستگاه و قرارگیری قسمت‌های کندانسور و جمع‌کننده در پایین آون مایکروویو، از نیروی جاذبه برای حرکت اسانس به سمت کندانسور استفاده شده است. این سیستم طراحی باعث کاهش چشمگیر زمان فرآیند نسبت به سیستم‌های معمول می‌گردد. این روش برای استخراج اسانس از گیاه تازه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این مطالعه، توانمندی روش استخراج MDG برای جداسازی اسانس رزماری و مقایسه آن با روش-

² Hydro-Distillation

³ Microwave-Assisted Hydro-Distillation

⁴ 2,2-Di-Phenyl-1-Picryl Hydrazyl

¹ Microwave Dry-diffusion and Gravity

Manzocco (۱۹۹۸) کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از محلول متانولی اسانس در غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH مخلوط و ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Rayleigh- Model VIS-7220G/UV-9200 - Beijing Beifen-Ruili Analytical Instrument (Group) Co., Ltd. Beijing, China) اندازه‌گیری شد. درصد بازداری رادیکال آزاد DPPH بر اساس معادله زیر محاسبه گردید:

$$I\% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

A_0 جذب نمونه بدون آنتی‌کسیدان و A_1 جذب نمونه در غلظت‌های مختلف است. IC_{50} از درون یابی منحنی غلظت-جذب محاسبه گردید. IC_{50} غلظتی از اسانس است که ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH اولیه مهار (غیرفعال) شده باشد.

تعیین ترکیب اسانس رزماری با استفاده از کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنج جرمی

برای اندازه‌گیری ترکیبات اسانس رزماری، از دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent Technologies 7890A، آمریکا) متصل به طیف‌سنج جرمی (مدل Agilent Technologies 5975C، آمریکا) استفاده شد. در این قسمت نمونه‌ها مجدداً به وسیله سولفات سدیم بی‌آب، خشک و به وسیله یک میلی‌لیتر نرمال هگزان رقیق شدند. پس از مخلوط کردن کامل نمونه با حلال، یک میکرولیتر از آن به دستگاه GC/MS تزریق گردید. دمای قسمت تزریق نمونه، ۲۸۰ درجه‌سانتی-گراد و گاز مورد استفاده، هلیم (۹۹/۹۹٪) با سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه بود. سیستم در حالت تقسیم با نسبت تقسیم ۱:۱۰۰ تنظیم شده بود. ستون دستگاه (مدل HP-5، Agilent Technology Inc.)، MS (آمریکا) از نوع موئینه با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای ستون، با سرعت ۳ درجه‌سانتی‌گراد در دقیقه، از ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد به ۲۱۰ درجه‌سانتی-گراد رسانده شد. بلافاصله پس از آن با سرعت ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۲۴۰ درجه‌سانتی-

می‌شوند. اسانس در قسمت پایینی در جمع‌کننده دستگاه و بالای آب (در اثر اختلاف دانسیته) جمع می‌شود. در این روش ۱۰۰ گرم رزماری تازه با استفاده از توان ثابت ۵۰۰ وات برای ۵ دقیقه حرارت داده شد. هر ۱ دقیقه یک بار اسانس استخراج شده اندازه‌گیری شد و بازدهی نهایی بر اساس گرم اسانس در ۱۰۰ گرم وزن خشک رزماری گزارش گردید.

روش استخراج به کمک MAHD

در روش MAHD، از آون مایکروویو ۲/۴۵ گیگاهرتز (ME3410W، سامسونگ، مالزی) با حداکثر توان خروجی ۱۰۰۰ وات استفاده شد. ظرف استخراج داخل آون مایکروویو دارای حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بود که متصل به کلونجر قرار گرفته بر روی آون مایکروویو بود (شکل ۱-ب). در روش MAHD میزان ۵۰ گرم رزماری و ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر (نسبت ۱ به ۹) با استفاده از توان ثابت ۵۰۰ وات برای ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. هر ۵ دقیقه یک بار اسانس استخراج شده اندازه‌گیری و بازدهی نهایی بر اساس گرم اسانس بر ۱۰۰ گرم نمونه گزارش شد.

روش استخراج به کمک HD

روش HD نیز با شرایط مشابه روش MAHD انجام گرفت (شکل ۲-ج). در این روش از گرمکن برقی (EM2000/C, Electrothermal Engineering Ltd., UK, 500 W) به جای آون مایکروویو و به مدت ۱۲۰ دقیقه استفاده و هر ۳۰ دقیقه یک بار اسانس استخراج شده اندازه‌گیری شد. اسانس‌های استخراج شده به کمک روش‌های مختلف، پس از جمع‌آوری توسط سولفات سدیم بی‌آب خشک و در فریزر ۸۰- درجه‌سانتی‌گراد تا آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به کمک رادیکال آزاد DPPH

رادیکال آزاد DPPH یک ترکیب رنگی پایدار است که توانایی بالایی در جذب اتم‌های هیدروژن از آنتی-اکسیدان‌ها و تشکیل کمپلکس بی‌رنگ DPPH را دارد (Diouf et al., 2009). مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط اسانس بر اساس روش اصلاح شده با

تمامی آزمایش‌ها در این پژوهش در ۳ تکرار انجام شدند. نتایج حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

به‌منظور تحلیل میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال $P < 0.05$ استفاده گردید. رسم منحنی-ها با نرم‌افزار Excel 2013 و Chromatography Data Handling System انجام شد.

نتایج و بحث

مشخصات دمایی

در شکل ۲-الف مشخصات دمایی طی استخراج به کمک روش‌های HD، MAHD و MDG برای اسانس رزماری نشان داده شده است. دمای اولیه نمونه در تمامی روش‌های استخراج، ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای استخراج بر اساس نقطه جوش آب (۱۰۰ درجه‌سانتی‌گراد) در فشار اتمسفر محاسبه می‌گردد. سرعت افزایش دما بر اساس شیب نمودار مشخصات دمایی اندازه‌گیری می‌شود. طبق نتایج جدول ۱، سرعت افزایش دما در روش‌های استخراج به کمک امواج مایکروویو نسبت به روش HD بسیار بیشتر می‌باشد. وجود آب به علت ثابت دی‌الکتریک بالا و جذب سریع پرتوهای مایکروویو می‌تواند علت پدیده افزایش سریع دما باشد (Kaufmann, & Christen, 2002). این نتایج با نتایج Mazidi و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطابقت دارد. آنها گزارش کردند روش MAHD به علت افزایش سریع دما و خروج سریع‌تر قطرات اسانس، نسبت به روش HD از سرعت استخراج بالاتری برخوردار است. اولین قطره اسانس برای روش HD، MAHD و MDG به ترتیب بعد از ۲۵، ۴ و ۱ دقیقه مشاهده گردید. علت اصلی این اختلافات، تفاوت در نوع انتقال حرارت (پرتودهی، جابجایی و همرفت) در روش‌های مایکروویو می‌باشد. البته روش MDG علاوه بر نوع انتقال حرارت، نیروی جاذبه نیز در خروج اسانس مؤثر می‌باشد.

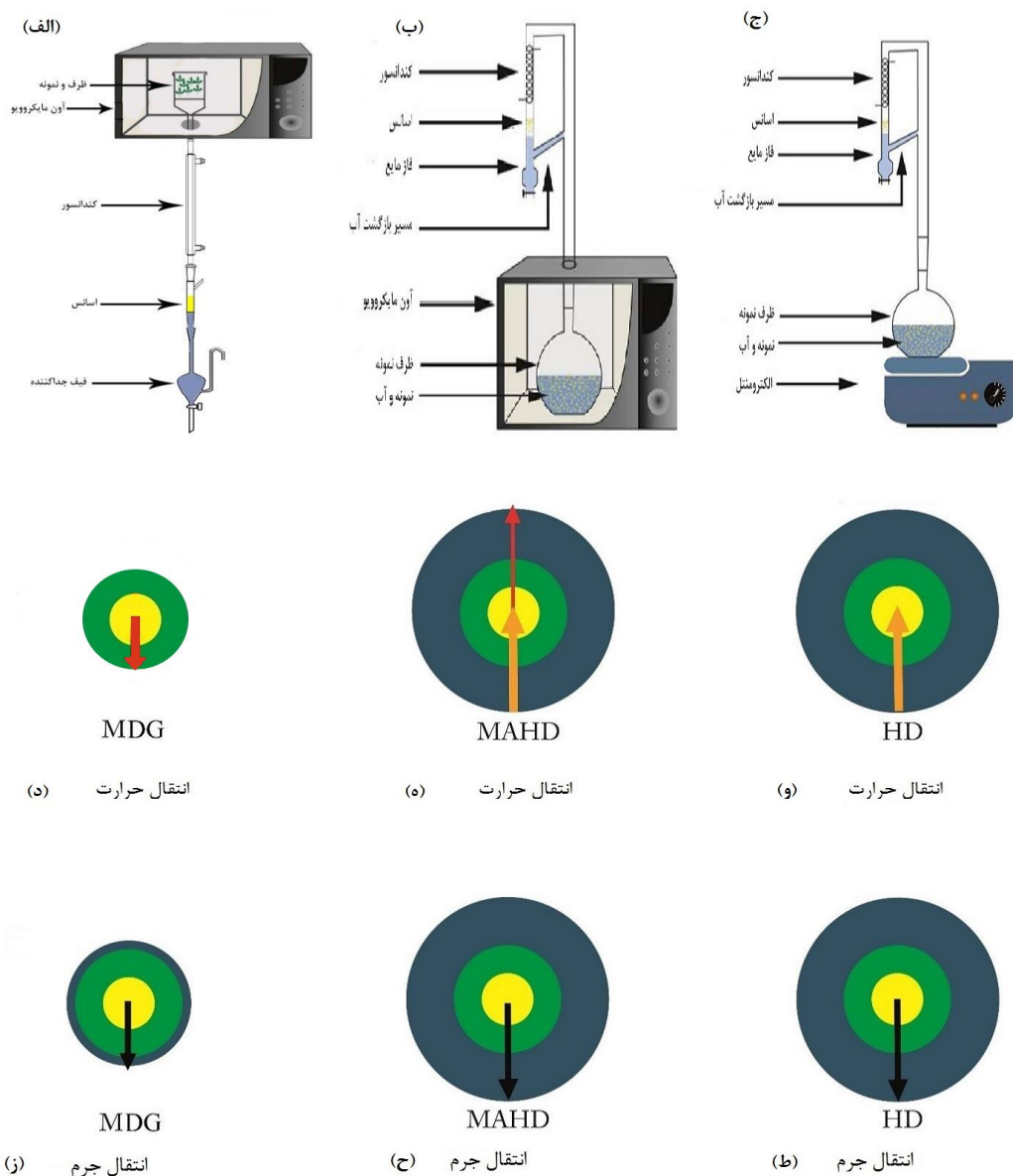
گراد رسانده شد و به مدت ۸/۵ دقیقه در این دما نگهداری شده کل زمان اجرایی دستگاه ۶۰ دقیقه بود. زمان تأخیر حلال در شناساگر طیف‌سنج جرمی ۳ دقیقه، دامنه جرم ۴۵-۵۵۰ amu، دمای منبع طیف-سنج جرمی ۲۳۰ درجه‌سانتی‌گراد، دمای کواد طیف-سنج جرمی ۲۵۰ درجه‌سانتی‌گراد و دمای خط انتقال ۲۸۰ درجه‌سانتی‌گراد بود.

پس از انجام تزریقات و به‌دست آوردن کروماتوگرام، شناسایی و تعیین مقدار هر یک از ترکیبات با استفاده از طیف جرمی آنها انجام شد. تعیین نوع ماده ورودی به طیف‌سنج جرمی بر اساس داده‌های کتابخانه‌ای وایلی (Wiley Registry 10th Edition/NIST 2012 Mass Spectral Library (Upgrade), ISBN: 978-1-118-61613-0 صورت گرفت. ضمناً، نمونه استاندارد از آلکان‌های نرمال با همان برنامه دمایی و ستون تزریق شد. شاخص ماند ترکیبات موجود در اسانس رزماری با استفاده از زمان ماند آلکان‌های نرمال تزریق شده، تعیین گردید.

اندازه‌گیری میزان انرژی مصرفی و دی‌اکسید کربن منتشر شده

محاسبه میزان انرژی مصرفی و دی‌اکسید کربن تولید شده بر اساس روش Golmakani و همکاران در سال ۲۰۰۸a انجام شد. برای محاسبه میزان انرژی مصرفی در طول استخراج (کیلووات ساعت) از توان مصرفی (کیلووات) در زمان (ساعت) استفاده شد. همچنین میزان انرژی مصرفی به ازای میزان اسانس استخراج شده نیز محاسبه گردید. در اندازه‌گیری میزان دی‌اکسید کربن تولید شده به ازای هر کیلووات‌ساعت انرژی مصرفی، ۸۰۰ گرم دی‌اکسید کربن تولید می‌شود (Golmakani et al., 2008a). توان مصرفی آون مایکروویو و گرمکن برقی به کمک وات‌مترسنج اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

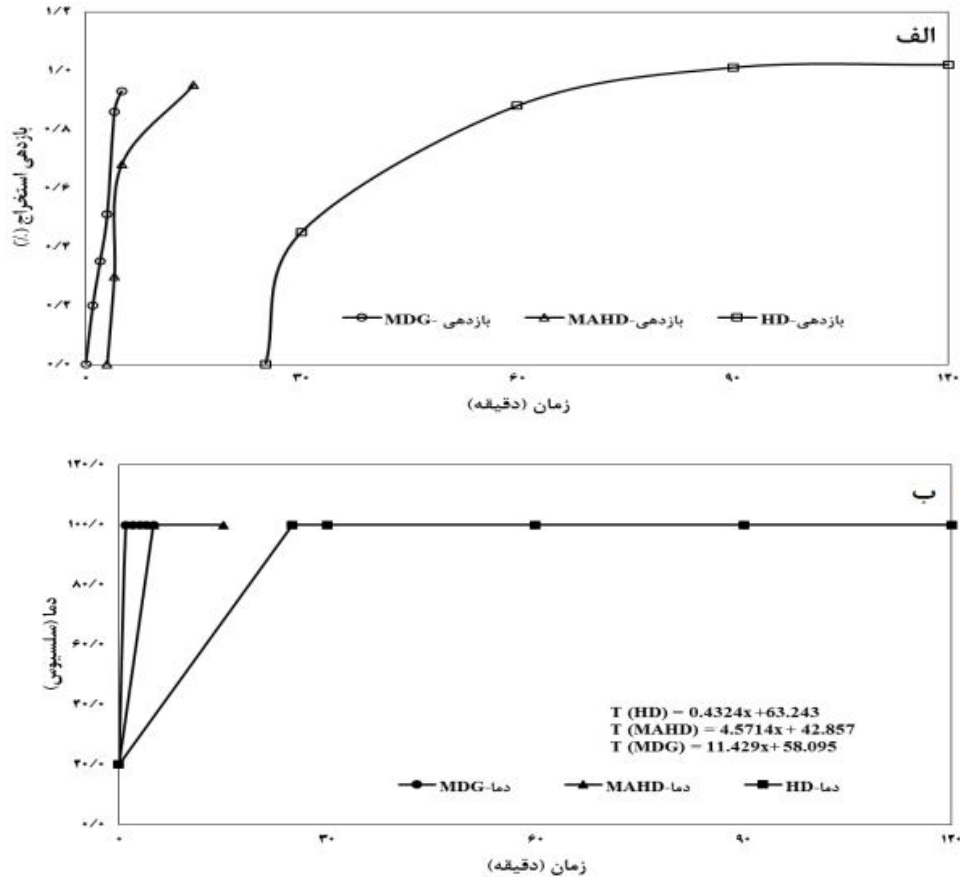


شکل ۱- نمایش شماتیک دستگاه‌های استخراج، انتقال حرارت و انتقال جرم در روش‌های استخراج اسانس رزماری به کمک نفوذ خشک مایکروویو و گرانش (MDG)، تقطیر با آب به کمک مایکروویو (MAHD) و تقطیر با آب (HD).

جدول ۱- اثر روش‌های مختلف استخراج بر زمان فرآیند، بازدهی نهایی استخراج و افزایش دما بر استخراج اسانس رزماری

MDG	MAHD	HD	متغیرهای استخراج
۱۱/۴۲۹ ^a	۴/۵۷۱ ^b	۰/۴۳۳ ^{c*}	سرعت افزایش دما (درجه‌سانتی‌گراد بر دقیقه)
۱ ^c	۴ ^b	۲۵ ^a	زمان شروع استخراج اسانس (دقیقه)
۴ ^c	۱۱ ^b	۹۵ ^a	مدت زمان استخراج اسانس (دقیقه)
۰/۹۵ ^a	۱/۰۱ ^a	۰/۹۳ ^a	بازدهی نهایی (درصد، وزنی / وزنی)
۰/۱۹ ^a	۰/۰۷ ^b	۰/۰۱ ^c	سرعت استخراج اسانس (گرم بر دقیقه)

*در هر ردیف میانگین‌های ارائه شده با حروف کوچک متفاوت، از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).



شکل ۲- سینتیک بازدهی و (ب) دمای استخراج اسانس رزماری در روش نفوذ خشک مایکروویو و گرانش (MDG)، تقطیر با آب به کمک مایکروویو (MAHD) و تقطیر با آب (HD).

می‌باشد. در روش HD انتقال حرارت از خارج به داخل می‌باشد زیرا فرآیندهای همرفت و جابجایی در آب پیرامون برگ‌های رزماری رخ می‌دهند درحالی که مکانیسم استخراج در روش MAHD علاوه بر همرفت و جابجایی در آب پیرامون رزماری، به دلیل تأثیر امواج مایکروویو بر آب درون سلولی (سیتوپلاسمی) موجود در برگ رزماری از داخل به خارج نیز انجام می‌شود. در روش استخراج MDG به دلیل عدم وجود حلال (آب)، انتقال حرارت تنها از داخل به خارج برگ رزماری می‌باشد. در این روش بازدهی نهایی استخراج اسانس به دلیل انتشار بخار از داخل به خارج گیاه و ترکیب دو پدیده انتقال حرارت و انتقال جرم افزایش می‌یابد (شکل ۱-د-و)

جدول ۱ اثر روش‌های مختلف استخراج بر روی زمان کل استخراج، طول زمان استخراج (تفاوت زمان کل فرآیند با زمان شروع استخراج)، بازدهی نهایی و

بازدهی نهایی استخراج اسانس رزماری

بازدهی نهایی و زمان استخراج اسانس رزماری با روش‌های مختلف در شکل ۲- ب آمده است. طبق نتایج بدست آمده، تفاوت معنی‌داری در بازدهی نهایی روش‌های مختلف استخراج مشاهده نگردید. روش HD به‌عنوان روش مرجع در استخراج اسانس شناخته می‌شود. بازدهی نهایی استخراج اسانس از روش‌های MDG، MAHD و HD به ترتیب ۰/۹۵، ۱/۰۱ و ۰/۹۳ درصد بدست آمد. از جمله عوامل مؤثر بر بازدهی نهایی استخراج با امواج مایکروویو می‌توان به ترکیب دو مکانیسم انتقال جرم و حرارت و اثر تشدید کنندگی آنها بر هم اشاره کرد. انتقال جرم در روش‌های HD، MAHD و MDG مشابه و از داخل به خارج است (شکل ۱-ز-ط) اما مکانیسم انتقال حرارت در روش‌های استخراج به کمک مایکروویو (MDG و MAHD) در مقایسه با روش HD متفاوت

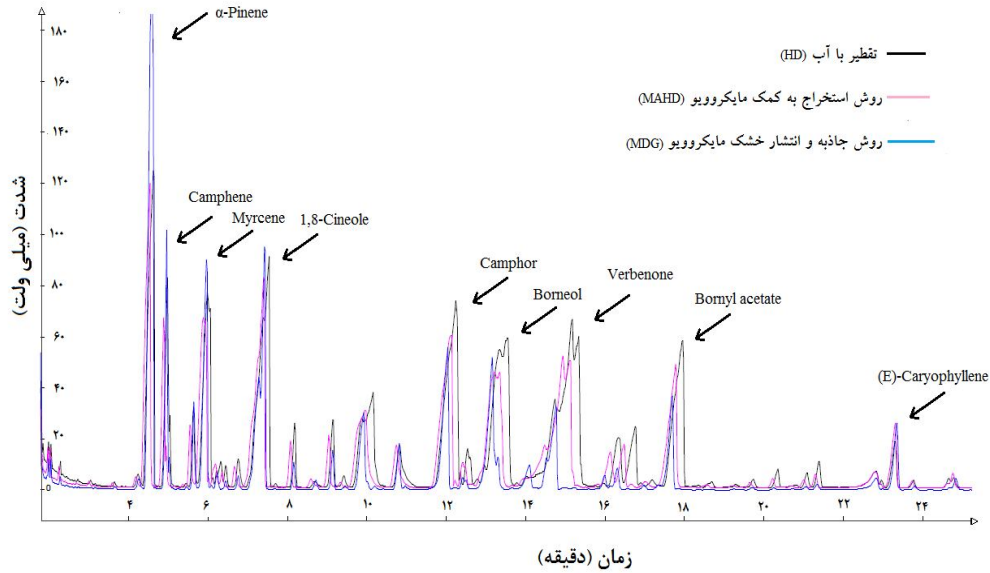
(گرم) به مدت زمان استخراج (دقیقه) بدست می‌آید. میانگین سرعت استخراج در روش‌های MDG، MAHD و HD به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۰۷ و ۰/۰۱ محاسبه گردید. نتایج بدست آمده سرعت استخراج اسانس رزماری در روش MDG در مقایسه با روش-های MAHD و HD به ترتیب ۱۹ و ۲/۵ برابر بیشتر بود. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که روش‌های استخراج به کمک مایکروویو به دلیل استفاده از سیستم انتقال حرارت تابشی نسبت به روش HD سریع‌تر عمل می‌کنند. در مقایسه دو روش MAHD و MDG، روش MDG به علت نیروی جاذبه و خروج اسانس از پایین دستگاه و همچنین استفاده از آب درون سلولی جهت تخریب سریع‌تر و کار آمدتر، از سرعت استخراج بالاتری برخوردار است.

تعیین ترکیبات اسانس رزماری به کمک GC/MS

ترکیبات اسانس رزماری استخراج شده به کمک روش‌های مختلف استخراج GC/MS تعیین شدند (شکل ۳). درصد ترکیبات اسانس‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. اگر چه ترکیبات فرار شناسایی شده در هر سه روش MDG، MAHD و HD مشابه بودند، اما درصد ترکیبات اسانس رزماری استخراج شده در دو روش MAHD و HD با روش MDG متفاوت بود. دلیل این مسأله را می‌توان به توانایی روش MDG در استخراج ترکیبات با وزن مولکولی پایین‌تر (مانند مونوترپن‌های هیدروکربنی) و انتخابی بودن این روش در استخراج این ترکیبات نسبت داد.

سرعت استخراج اسانس را نشان می‌دهد. روش‌های MDG و MAHD به شکل معنی‌داری سریع‌تر از روش HD بودند. استخراج کامل اسانس رزماری در روش-های MDG، MAHD و HD به ترتیب پس از ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه انجام شد. دلیل اصلی این اختلاف‌ها، انتقال سریع‌تر حرارت و جرم در روش‌های مایکروویو است. Ferhat و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند زمان بسیار کمتری برای استخراج اسانس پوست پرتقال در روش استخراج به کمک مایکروویو (۱۲ دقیقه) نسبت به روش تقطیر با بخار آب (۴۰ دقیقه) مورد نیاز می‌باشد. مطابق با یافته‌های این تحقیق، Bousbia و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند ۱۵ دقیقه استخراج اسانس به کمک مایکروویو و جاذبه برابر با ۱۸۰ دقیقه روش تقطیر با آب می‌باشد.

میان بازدهی نهایی استخراج اسانس در روش‌های HD بعد از ۱۲۰ دقیقه، MAHD بعد از ۱۵ دقیقه و MDG بعد از ۵ دقیقه اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. از آن جایی که میزان اسانس در گیاه ثابت و مشخص می‌باشد میزان بازدهی نهایی روش‌های مختلف استخراج مشابه اما کینتیک استخراج آنها متفاوت می‌باشد. Rezaei و Golmakani در سال ۲۰۰۸b گزارش کردند بازدهی نهایی استخراج اسانس آویشن با روش‌های HD و MAHD به ترتیب ۳/۴۴ و ۳/۶۶ درصد بر اساس وزن خشک بوده و هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین بازدهی نهایی گزارش نگردید. سرعت استخراج اسانس در روش‌های HD، MAHD و MDG در جدول ۱ نشان داده شده است. این شاخص از تقسیم میزان اسانس استخراج شده



شکل ۳- کروماتوگرام ترکیبات اسانس رزماری بدست آمده از روش‌های تقطیر با آب (HD)، تقطیر با آب به کمک مایکروویو (MAHD) و نفوذ خشک مایکروویو و گرانش (MDG)

جدول ۲- ترکیب اسانس رزماری استخراج شده به کمک روش‌های مختلف

روش استخراج			شاخص ماند	زمان ماند	فرمول شیمیایی	ترکیبات	ردیف
MDG	MAHD	HD					
۲۶/۵۵ ^a	۱۰/۴۴ ^b	۹/۵۹ ^{b*}	۹۳۴	۴/۶۲	C ₁₀ H ₁₆	آلفا-پینین	۱
۶/۱۳ ^a	۳/۷۰ ^b	۴/۰۰ ^b	۹۴۷	۴/۹۷	C ₁₀ H ₁₆	کامفن	۲
۱/۸۹ ^a	۱/۳۹ ^a	۱/۱۹ ^a	۹۸۳	۵/۶۱	C ₈ H ₁₆ O	۳-اکتانول	۳
۸/۵۹ ^a	۹/۱۱ ^a	۷/۷۴ ^a	۹۸۹	۵/۹۶	C ₁₀ H ₁₆	میرسن	۴
۱۴/۳۲ ^a	۱۱/۵۹ ^b	۱۱/۵۵ ^b	۱۰۳۰	۷/۵۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۱،۸-سینئول	۵
۰/۶۷ ^a	۰/۸۵ ^a	۰/۹۴ ^a	۱۰۵۵	۸/۱۷	C ₁₀ H ₁₆	گاما-ترپینن	۶
۱/۰۳ ^a	۱/۴۸ ^a	۱/۴۳ ^a	۱۰۸۶	۹/۱۳	C ₁₀ H ₁₆	ترپینولن	۷
۴/۰۲ ^b	۶/۲۴ ^a	۶/۲۸ ^a	۱۰۹۹	۱۰/۱۴	C ₁₀ H ₁₈ O	لینالول	۸
۱/۳۵ ^a	۱/۷۵ ^a	۱/۵۱ ^a	۱۱۲۲	۱۰/۸۱	C ₁₀ H ₁₄ O	کریسانتنون	۹
۷/۹۶ ^b	۱۰/۵۸ ^a	۱۰/۶۳ ^a	۱۱۴۳	۱۲/۲۲	C ₁₀ H ₁₆ O	کامفور	۱۰
۸/۶۸ ^a	۱/۱۱ ^b	۱/۰۶ ^b	۱۱۵۷	۱۲/۵۲	C ₁₀ H ₁₆ O	ترانس-پینوکامفورن	۱۱
۵/۷۸ ^b	۱۰/۷۵ ^a	۱۱/۷۷ ^a	۱۱۶۴	۱۳/۵۳	C ₁₀ H ₁₈ O	بورنئول	۱۲
۰/۹۶ ^b	۱۶/۳۵ ^a	۱۶/۷۰ ^a	۱۲۰۸	۱۵/۱۶	C ₁₀ H ₁₄ O	وربنون	۱۳
۱/۵۸ ^b	۳/۴۵ ^a	۳/۸۹ ^a	۱۲۳۹	۱۶/۷۵	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	ایزوبرنیل فرمات	۱۴
۴/۷۴ ^b	۷/۰۶ ^a	۸/۰۹ ^a	۱۲۸۴	۱۷/۹۵	C ₁₂ H ₂₀ O	برنیل استات	۱۵
۲/۷۸ ^a	۰/۶۲ ^c	۱/۴۴ ^b	۱۳۶۶	۲۱/۳۸	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	نئو ایزو-دی	۱۶
						هیدروکارونل استات	
۲/۹۶ ^a	۳/۶۵ ^a	۲/۱۹ ^a	۱۴۱۶	۲۳/۳۹	C ₁₅ H ₂₄	ترانس-کاروفیلن	۱۷

*در هر ردیف میانگین‌های ارائه شده با حروف کوچک متفاوت، از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

تفاوت معنی‌داری میان IC_{50} روش‌های MAHD و MDG با IC_{50} روش HD (۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده گردید. تفاوت جزئی معنی‌داری در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دلیل تفاوت درصد ترکیبات استخراج شده می‌باشد. به شکل کلی، روش استخراج به کمک امواج مایکروویو تأثیر مخربی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های استخراج شده نداشته است. مطابق با یافته‌های این تحقیق، در دیگر پژوهش‌ها نیز میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رزماری ۸۶-۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (Mata et al., 2007; Almela et al., 2006). تحقیقات نشان می‌دهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی به فرآیند استخراج و ترکیبات اسانس بستگی دارد (Cavero et al., 2005).

کاهش هزینه و انرژی و مشکلات زیست محیطی
انرژی مصرفی در روش‌های HD، MAHD و MDG به ترتیب ۱، ۰/۱۳ و ۰/۰۴ کیلووات‌ساعت بود (جدول ۳) که به علت سرعت بالای استخراج در روش MDG میزان مصرف انرژی به میزان ۹۶ درصد کمتر از روش HD است. Rezaei و Golmakani در سال ۲۰۰۸ نیز گزارش کردند که استفاده از امواج مایکروویو مصرف انرژی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. در نتیجه، هزینه‌های پایین استخراج با روش MDG یکی از مزایای اصلی این روش به دلیل کوتاه بودن زمان استخراج و پایین بودن انرژی مصرفی است. آلاینده‌های زیست محیطی نیز به کمک شاخص میزان دی‌اکسید کربن آزاد شده در اتمسفر محاسبه شد. میزان دی‌اکسید کربن تولیدی در روش‌های HD، MAHD و MDG به ترتیب ۸۰۰، ۱۰۴ و ۳۲ گرم بود (جدول ۳). همچنین میزان دی‌اکسید کربن تولید شده در روش MDG ۹۶ درصد نسبت به روش HD کمتر بود. Rezaei و Golmakani در سال ۲۰۰۸ نیز گزارش کردند که استفاده از امواج مایکروویو تولید دی‌اکسید کربن را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

بیشترین ترکیب در روش MDG، آلفا پینن^۱ (مونوترپن هیدروکربنی، ترکیب شماره ۱) با میزان ۲۶/۵۵ درصد بود. میزان این ترکیب در روش‌های MAHD و HD به ترتیب ۱۰/۴۴ و ۹/۵۹ درصد اندازه‌گیری شد. وربنون^۲ (مونوترپن اکسیژن‌دار، ترکیب شماره ۱۳) دیگر ترکیب اصلی اسانس رزماری می‌باشد. میزان وربنون در روش‌های MAHD و HD به ترتیب ۱۶/۲۵ و ۱۶/۷۰ درصد و در روش MDG ۰/۹۶ درصد بود. ترکیبات استخراج شده در این تحقیق با سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد (Panizzi et al., 1993; Kabouche et al., 2005; Quispe-Condori et al., 2005; Sacchetti et al., 2005; Gachkar et al., 2007). اما درصدهای گزارش شده متفاوت می‌باشند. تفاوت ترکیبات اسانس رزماری قبلاً نیز گزارش شده است (Sacchetti et al., 2005). تفاوت ترکیب شیمیایی اسانس‌ها می‌تواند به دلیل تأثیر شرایط آب و هوایی بر روی گیاه، (Gachkar et al., 2007) ژنوتیپ و تفاوت محیطی گونه‌ها، زمان استخراج نمونه و روش استخراج استفاده شده باشد. در روش MAHD تغییری در ترکیب اسانس ایجاد نشد اما در MDG تفاوت وجود داشت. چون تنها از رطوبت درون سلولی برای استخراج استفاده شده و سرعت استخراج بالاست، ترکیبات سبک‌تر با وزن مولکولی پایین‌تر بیشتر استخراج می‌شوند. چون درصد ترکیبات سبک هیدروکربنی افزایش می‌یابد. در نتیجه درصد ترکیبات سنگین اکسیژن‌دار کاهش می‌یابد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH

مهار رادیکال آزاد DPPH توسط آنتی‌اکسیدان (اسانس) به کمک شاخص IC_{50} بیان می‌شود (Kanner et al., 1994; Vinson et al., 1995; Xu et al., 2005). پایین بودن IC_{50} نشان دهنده بالا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. همه نمونه‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی بوده و کمترین میزان IC_{50} (۶۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مربوط به روش MDG و بیشترین میزان IC_{50} (۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مربوط به روش MAHD بود. علاوه بر این،

¹ alpha-Pinene

² Verbenone

جدول ۳- مصرف انرژی و آلاینده‌گی زیست‌محیطی روش‌های مختلف استخراج اسانس رزماری

MDG	روش استخراج		متغیرهای استخراج
	MAHD	HD	
۰/۰۴ ^c	۰/۱۳ ^b	۱/۰۰ ^a	انرژی مصرفی (kWh)
۰/۰۴ ^c	۰/۱۳ ^b	۱/۰۷ ^a	انرژی مصرفی نسبت به اسانس (kWh/g)
۳۳ ^c	۱۰۴ ^b	۸۰۰ ^a	دی‌اکسید کربن آزاد شده (g)
۳۴ ^c	۱۰۳ ^b	۸۶۰ ^a	دی‌اکسید کربن آزاد شده نسبت به اسانس

*در هر ردیف میانگین‌های ارائه شده با حروف کوچک متفاوت، از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

این روش استخراج، توانایی بالایی در استخراج ترکیبات با وزن مولکولی پایین داشته و در عین حال اثر نامطلوبی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس استخراج شده نداشته است. این روش جدید می‌تواند بدون مصرف حلال و هیچ‌گونه باقیمانده اسانس را استخراج کند. به‌شکل کلی، به‌دلیل زمان و هزینه پایین، خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسب و تولید دی‌اکسید کربن پایین و دوست‌دار محیط زیست برای استخراج اسانس پیشنهاد می‌شود.

در این پژوهش امکان استفاده از روش نفوذ خشک مایکروویو و گرانش جهت استخراج اسانس رزماری و بررسی ویژگی‌های کیفی اسانس استخراج شده نسبت به روش سنتی تقطیر با آب و روش متداول مایکروویو مورد بررسی قرار گرفت. روش نوین MDG یک سیستم استخراج جدید و ترکیبی از روش‌های استخراج با مایکروویو، تقطیر و نیروی جاذبه زمین با بازدهی بالا و انتخابی بودن استخراج ترکیبات زیست فعال می‌باشد. این روش کاملاً سریع بوده و مصرف انرژی و آلودگی زیست محیطی پایینی دارد. همچنین

منابع

- 1- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J. & Rabe, V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120: 221-229.
- 2- AOCS. 1993. Official Method Ja 2a-46, Champaign, IL.
- 3- Bousbia, N., Abert Vian, M., Ferhat, M.A., Meklati, B.Y. & Chemat, F. 2009. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90: 409-413.
- 4- Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. & Bessiere, J. M. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 481-484.
- 5- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- 6- Cavero, S., Jaime, L., Martín-Álvarez, P. J., Senorans, F. J., Reglero, G. & Ibañez, E. 2005. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary

- (*Rosmarinus officinalis* L.). European Food Research and Technology, 221: 478-486.
- 7- Craveiro, A., Matos, F., Alencar, J. & Plumel, M. 1989. Microwave oven extraction of an essential oil. Flavour and Fragrance Journal, 4: 43-44.
 - 8- Daferera, D. J., Ziogas, B. N. & Polissiou, M. G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2576-2581.
 - 9- Diouf, P. N., Stevanovic, T. & Cloutier, A. 2009. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. Food Chemistry, 113: 897-902.
 - 10- Eskilsson, C. S. & Björklund, E. 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. Journal of Chromatography A, 902: 227-250.
 - 11- Ferhat, M. A., Meklati, B.Y., Smadja, J. & Chemat, F. 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential from orange peel. Journal of Chromatography A, 1112: 121-126.
 - 12- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A. & Rasooli, I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry, 102, 898-904.
 - 13- Golmakani, M.T. & Rezaei, K. 2008a. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Food Chemistry, 109, 925-930.
 - 14- Golmakani, M. T. & Rezaei, K. 2008b. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. European Journal of Lipid Science and Technology, 110: 448-454.
 - 15- Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z. & Benlabed, K. 2005. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. International Journal of Aromatherapy, 15: 129-133.
 - 16- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. & Kinsella, J. E. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 64-69.
 - 17- Kaufmann, B. & Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. Phytochemical Analysis, 13: 105-113.
 - 18- Lane, D. & Jenkins, S.D. 1984. Presented at the 9th International Symposium on Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Columbus, OH, Abstracts, p. 437.
 - 19- Luque-Garcia, J. & De Castro, M. L. 2004. Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. Talanta, 64: 571-577.
 - 20- Manzocco, L., Anese, M. & Nicoli, M. 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. LWT-Food Science and Technology, 31: 694-698.

- 21- Mata, A., Proença, C., Ferreira, A., Serralheiro, M., Nogueira, J. & Araújo, M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103: 778-786.
- 22- Mazidi, S., Rezaei, K., Golmakani, M. T., Sharifan, A. & Rezazadeh, S.H. 2012. Antioxidant activity of essential oil from Black zira (*Bunium persicum* Boiss.) obtained by microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14: 1013-1022.
- 23- Metaxas, A. A. & Meredith, R. J. 1983. *Industrial microwave heating: The Institution of Engineering and Technology*, London.
- 24- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. & Morelli, I. 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 39: 167-170.
- 25- Paré, J.J. 1992. Microwave assisted process for extraction and apparatus therefore. CA Patents number 2,055,390.
- 26- Pare, J.J. 1994. Microwave extraction of volatile oils. US Patents number 5,338,557.
- 27- Paré, J.J. & Bélanger, J. M. 1997. Microwave-assisted process (MAP™) principles and applications. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 18: 395-420.
- 28- Paré, J.J., Sigouin, M. & Lapointe, J. 1991. Microwave-assisted natural product extraction. US Patents number 5,002,784.
- 29- Paré, J.J., Sigouin, M. & Lapointe, J. 1990. Extraction of natural products assisted by microwaves. EP Patents number 398-798.
- 30- Quispe-Condori, S., Sánchez, D., Foglio, M. A., Rosa, P. T., Zetzi, C., Brunner, G. & Meireles, M. A. A. 2005. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. leaves using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 36: 40-48.
- 31- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. & Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- 32- Vian, M. A., Fernandez, X., Visinoni, F. & Chemat, F. 2008. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1190: 14-17.
- 33- Vinson, J. A., Jang, J., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M. & Cai, S. 1995. Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2798-2799.
- 34- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G. & Fu, Y. J. 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108: 1019-1022.

-
- 35- Xu, J., Chen, S., & Hu, Q. 2005. Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum* L.). Food Chemistry, 91: 79-83.

A Comparative study on microwave dry-diffusion and gravity extraction method on the quality of rosemary essential oil

Ehsan Shad¹, Hadi Hashemi Gahruie¹, Mohammad-Taghi Golmakani^{2*}, Sara Mazidi¹

1- Graduated MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Collage of Agriculture, Shiraz University, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Iran

*Corresponding author: (golmakani@shirazu.ac.ir)

Abstract

Microwave dry-diffusion and gravity extraction (MDG) is an advanced microwave-assisted extraction technique. The aim of this study, was a comparison of different extraction methods namely MDG, microwave-assisted hydrodistillation (MAHD), and hydrodistillation (HD) methods and also evaluation of their effectiveness in isolation of essential oils from fresh *Rosmarinus officinalis* leaves. Variables such as extraction yield, extraction time, chemical composition, antioxidant activity, and operation cost were compared. The obtained results showed that the extraction times of essential oil by MDG, MAHD, and HD were 5, 15, and 120 min, respectively and energy consumptions were 0.04, 0.13, and 1.00 kW h, respectively. MDG offered important advantages over traditional HD method, namely increasing antioxidant activity (10.3%) and providing a more valuable essential oil components (α -pinene 17%, camphene 2.1%, and 1,8-cineole 2.8 % more than HD method). Gas chromatography/mass spectrometry analysis of the extracted essential oils indicated that microwave did not adversely influence the composition of the essential oils. In comparison with HD and MAHD, MDG required less energy, cost, and solvent. Hence, MDG can be proposed as a green and novel extraction technology.

Keywords: Essential oil, Extraction, Microwave, Rosemary