

*Research Article*

# Experimental Study and Optimization of Effective Parameters for the Extraction of the Anti-Cancer Compound Naringin Using Ultrasound Waves

Mojtaba Nosrati Omidvar<sup>1</sup>, Neda Gilani<sup>2\*</sup>, Hadiseh Masoumi<sup>3</sup>

1. Master's student, Department of Chemical Engineering, Technical and Engineering Faculty, Gilan University, Rasht, Iran.
2. Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Technical and Engineering Faculty, Gilan University, Rasht, Iran.
3. PhD student in Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Technical and Engineering Faculty, Gilan University, Rasht, Iran.

(Received Data: 10 October 2024, Revised Data: 20 December 2024, Accepted Data: 6 January 2025)

## Abstract

Naringin is an antioxidant and anti-cancer compound utilized in the synthesis of various important substances in pharmaceutical and medical sciences. In this research, naringin is extracted from orange peel using ethanol as a solvent and the ultrasonic extraction method. Design-Expert (DOE) software was employed to optimize key parameters, including extraction time, pH, and sample-to-solvent ratio, while maintaining a constant temperature of 40°C. The concentration and purity of naringin in the samples were analyzed using spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC). According to the DOE results, pH had the most significant impact on extraction efficiency compared to other parameters. The yield of naringin extraction increased in less time and under slightly acidic pH conditions. Maximum extraction efficiency was achieved at the beginning of the process. The optimal conditions for naringin extraction were determined to be 86.29% ethanol as the solvent, pH 6.52, extraction time of 20 minutes, a sample-to-solvent ratio of 0.24, and an extraction yield of 123.27 mg/L. The purity of naringin in the powder obtained from the orange peel extract was measured at 88.20%. The ANOVA model for ethanol solvent demonstrated a correlation coefficient of 0.96, indicating it as a reliable model for this extraction process.

**Keywords:** Orange Peel, Naringin, Yield, Purity Percentage

---

\* Corresponding author: [n.gilani@guilan.ac.ir](mailto:n.gilani@guilan.ac.ir)

**Introduction:** The food processing industry generates significant amounts of agricultural waste, contributing to environmental challenges. The citrus industry alone produces approximately 120 million tons of citrus fruits annually, with 40–60% of the fruit weight discarded as waste. Orange production, particularly in juice extraction, is a major contributor to the disposal of orange peels. These peels are rich in bioactive compounds, including enzymes, dietary fiber, carotenoids, and phenolic compounds. These bioactives exhibit antioxidant properties and provide numerous health benefits, such as chronic disease prevention and a reduced risk of cancer. Valorizing orange waste by extracting bioactive compounds like naringin presents valuable applications in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. The extraction process starts with selecting an appropriate solvent, with organic solvents such as ethanol proving effective for isolating bioactive compounds. Solid-liquid extraction, also known as leaching, is employed to isolate these compounds by transferring solubles from the solid matrix to the liquid phase. Key factors influencing the leaching process include temperature, pressure, extraction time, solvent type, solid-to-solvent ratio, and mixing efficiency. Extracting bioactive compounds using this method requires less energy and avoids harmful gas emissions compared to other techniques. Additionally, ultrasonic extraction enhances solvent penetration and molecular movement, enabling faster extraction and preserving heat-sensitive compounds under standard conditions. This research utilizes Response Surface Methodology (RSM) and Design of Experiments (DOE) to optimize naringin extraction from orange peels with ethanol. Key parameters such as pH, sample-to-solvent ratio, and extraction time are investigated, with the purity of the extracted naringin assessed using spectrophotometry and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

**Materials and methods:** Fresh, ripe, and uncontaminated oranges were sourced from the Kolacha region in Gilan, Iran, and thoroughly washed with distilled water to remove dust. After washing, the excess water was wiped off. The process utilized naringin powder (purity > 98%, Sigma Aldrich, Germany), hydrochloric acid (37%, Merck, Germany), buffer solutions (pH 4–8, Merck, Germany), and 96% ethanol (Merck, Germany). The orange peels were separated from the pulp, dried at 90°C for three hours, and then ground into a fine powder.

A solution of 450 mL distilled water was adjusted to pH 5 using hydrochloric acid, homogenized, and subjected to ultrasonic extraction at 50°C for 40 minutes using a 300 W, 40 kHz ultrasonic device. The resulting solution was filtered through a paper funnel into a clean plastic bottle and refrigerated at -10°C until frozen. After thawing, 10 mL of ethanol was added, and the solution's pH was adjusted using the desired buffer. The mixture was then stirred at a constant temperature of 40°C.

After the predetermined time, the solution was filtered through crepe paper into Falcon tubes, and 2 µL of naringin solution (1.5 g/L) was added. The orange peel extract was stored at +10°C in the refrigerator for 48 hours, followed by storage at room temperature for 72 hours to facilitate naringin precipitation. The resulting precipitate was collected and dried at 45°C for 70 minutes.

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC; Waters 2695 model with photodiode array detector Waters 996) with gradient elution was employed to analyze bioactive compounds. The purity of naringin was determined to be 88.20% after two repetitions. Response Surface Methodology (RSM) was utilized to optimize the extraction parameters, including pH, extraction time, and sample-to-solvent ratio.

**Results and discussion:** This study investigates the adsorption capacity and extraction efficiency of naringin, using analysis of variance (ANOVA) to evaluate the impact of parameters such as time, sample-to-solvent ratio, pH, and solvent type. P-values were calculated to determine the significance of each parameter, with values below 0.05 indicating crucial factors for extraction yield, while higher values suggested minimal effects. The results for ethanol solvent revealed significant interactions, particularly between time and sample-to-solvent ratio, as well as other parameter interactions that showed a lesser impact on the yield.

The F-value for ethanol was determined to be 27.02, confirming the model's significance, while the R<sup>2</sup> value exceeded 0.8, indicating a strong correlation between the experimental results and predicted values. Signal-to-noise ratios, which reflect model accuracy, were calculated at 20.69, further confirming the model's effectiveness. Response Surface Methodology (RSM) was used to generate equations that describe the relationship between influential parameters under ethanol conditions. Quadratic equations were established to optimize extraction efficiency by adjusting parameters such as time, sample-to-solvent ratio, and pH.

Graphical representations showed that the extraction yield increased with shorter extraction times and maintained pH levels between 6 and 7. Additionally, a stable sample-to-solvent ratio proved beneficial. After optimization, the study identified the following optimal extraction conditions for ethanol: a pH of 6.52, a 20-minute extraction duration, and a sample-to-solvent ratio of 0.24. These conditions resulted in a maximum naringin yield of 86.29%, corresponding to a concentration of 123.27 mg/L. Response Surface Methodology (RSM) effectively facilitated the determination of operational conditions for optimizing naringin extraction, confirming the significant relationships among the parameters analyzed. The findings highlight the interdependent nature of extraction factors and offer valuable insights for maximizing naringin yields in practical applications.

**Conclusions:** Orange peels contain the valuable pharmaceutical compound naringin, known for its anticancer properties. This study utilized Response Surface Methodology (RSM) to analyze the factors influencing naringin extraction. The leaching process, combined with ultrasound and using 96% ethanol, proved effective for extraction. Key parameters, including extraction time, pH, and sample-to-solvent ratio, were identified as significant factors in the process. A mathematical model demonstrated a correlation coefficient exceeding 0.96, indicating that a second-degree polynomial model is well-suited for optimizing naringin extraction. The optimal conditions for maximum yield were identified as 20 minutes of extraction at a pH of 6.52, a sample-to-solvent ratio of 0.24, and a temperature of 40°C. Under these conditions, the yield was 123.27 mg/L of naringin with a purity of 88.20%. The findings suggest that using 96% ethanol significantly enhances naringin extraction efficiency in a slightly acidic to neutral environment.

**Keywords:** Orange peel, Naringin, Yield, Purity percentage.

**How to cite this article:**

Nosrati Omidvar, M., Gilani, N., Masoumi, H. (2024) Experimental Study and Optimization of Effective Parameters for the Extraction of the Anti-Cancer Compound Naringin Using Ultrasound Waves, *Innov. Food Technol.*, 313-331., <https://doi.org/10.22104/IFT.2025.7149.2184>

## مقاله پژوهشی

## بررسی تجربی و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر استخراج ماده ضدسرطان

## نارینجین تحت امواج فراصوت

مجتبی نصرتی امیدوار<sup>۱</sup>، ندا گیلانی<sup>۲\*</sup>، حدیثه معصومی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳. دانش‌آموخته دکتری مهندسی شیمی، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.  
(تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۰۷/۱۹، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷)

## چکیده

نارینجین یک داروی ضدآکسیداسیون و ضدسرطانی است که برای سنتز برخی مواد مهم در زمینه علوم دارویی و پزشکی استفاده می‌شود. در این پژوهش ماده نارینجین از پوست پرتقال با استفاده از حلال اتانول به روش اولتراسونیک استخراج می‌شود. طراحی آزمایش به کمک نرم‌افزار دیزاین اکسپرت برای تعیین پارامترهای بهینه، از جمله زمان، pH و نسبت نمونه به حلال با ثابت نگه داشتن دما در ۴۰ °C استفاده شد. غلظت و خلوص نارینجین در نمونه‌ها نیز با استفاده از آنالیزهای اسپکتروفوتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، اندازه‌گیری شد. براساس نتایج آزمایش، مقدار pH تأثیر بیشتری در بازده استخراج نسبت به سایر پارامترها داشت. بازده استخراج نارینجین در زمان کمتر و مقادیر pH اسیدی بسیار ضعیف افزایش یافت. استخراج نارینجین در ابتدای فرایند به حداکثر مقدار خود رسید. در نهایت، بیشترین بازده استخراج نارینجین با استفاده از حلال اتانول ۸۶/۳٪ در pH=۶/۵، زمان ۲۰ دقیقه، نسبت نمونه به حلال ۰/۲۴ و میزان استخراج ۱۲۳/۲ mg/L تعیین شد. خلوص نارینجین در پودر به‌دست‌آمده از عصاره پوست پرتقال ۸۸/۲٪ اندازه‌گیری شد. مدل آنالیز واریانس برای حلال اتانول ضریب همبستگی ۰/۹۶ را نشان داد که می‌تواند یک مدل مناسب برای این فرایند استخراج باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پوست پرتقال، نارینجین، بازده، درصد خلوص.

## ۱. مقدمه

در فرآوری مواد غذایی مقدار زیادی ضایعات کشاورزی تولید می‌شوند که با تخلیه و رهاسازی در محیط زیست، زمینه‌ساز بروز مشکلات زیست‌محیطی فراوانی هستند [۱،۲]. صنعت مرکبات تولیدی نزدیک به ۱۲۰ میلیون تن در سال دارد که تقریباً ۴۰ تا ۶۰٪ از وزن میوه‌ها به‌عنوان زباله دور ریخته می‌شوند [۳]. در این صنعت، مصرف پرتقال بسیار است و تولید آب پرتقال می‌تواند منجر به ضایعات پوست پرتقال شود [۴]. پوست این میوه دارای منبعی از ترکیبات زیست‌فعال، مانند آنزیم‌ها، فیبرهای غذایی، کاروتنوئیدها<sup>۱</sup> و ترکیبات فنلی<sup>۲</sup> است [۵-۷]. این ترکیبات ارزشمند غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها، با طیف گسترده‌ای از مزایای سلامتی، پیشگیری از بیماری‌های مزمن، کاهش بروز سرطان و اعمال اثرات ضد اکسیداسیون هستند [۸،۹]؛ افزون‌براین ارزش‌گذاری ضایعات پرتقال می‌تواند برای استخراج و جداسازی ترکیبات زیست‌فعال، مانند ماده<sup>۳</sup> نارینجین جهت استفاده در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و دارویی به‌کار گرفته شود. نارینجین با خواص ضدالتهابی خود می‌تواند به کاهش التهاب در بدن کمک کند [۱۰، ۱۱]. اولین مرحله برای فرایند استخراج انتخاب حلال است؛ حلال‌های آلی مانند اتانول برای استخراج و افزایش بازده استخراج در ترکیبات زیست‌فعال، مانند نارینجین مناسب است. استخراج جامد-مایع که هدف آن جداسازی مخلوط از فاز جامد با استفاده از یک حلال مایع است، در فرایند استخراج انتقال املاح از جامدات بی‌اثر به حلال وجود دارد. عوامل مؤثر بر فرایند استخراج عبارت‌اند از دما، فشار، زمان، نوع حلال، نسبت وزن جامد به حلال و آشفتنگی جامدات و حلال‌ها. از مزیت‌های روش استخراج برای جداسازی مواد مؤثره نسبت به سایر روش‌ها مانند استخراج با حلال، انرژی کمتری لازم است، فرایند استخراج فرایندی مضر نیست، هیچ‌نوع آلاینده‌گازی تولید نمی‌کند و اجرای آسان‌تری

دارد. هرچه زمان استخراج طولانی‌تر باشد، هزینه هم افزایش می‌یابد. استخراج گسترده در صنایع بیولوژیکی<sup>۴</sup> و فرآوری مواد غذایی بیشتر دیده می‌شود [۱۲، ۱۳]. استفاده از دستگاه اولتراسونیک<sup>۵</sup> و امواج فراصوت باعث افزایش نفوذ حلال، سرعت حرکت مولکولی و در نتیجه سرعت استخراج می‌شود. همچنین امکان استفاده از یک استخراج‌کننده کمکی را نیز فراهم می‌سازد و سبب افزایش قطبیت فاز مایع می‌شود. فراصوت می‌تواند دمای عملیاتی را کاهش دهد و امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را در شرایط نرمال امکان‌پذیر سازد. همچنین زمان لازم برای استخراج با امواج فراصوت نسبت به استخراج سنتی، بسیار کوتاه‌تر است. استخراج با امواج فراصوت می‌تواند به حفظ خواص شیمیایی و بیولوژیکی ترکیبات کمک کند. استخراج با امواج فراصوت، به‌ویژه در استخراج مواد طبیعی، عصاره‌گیری از گیاهان دارویی، تولید مواد غذایی و حتی در صنایع دارویی کاربرد دارد [۱۴، ۱۵].

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که برای مدل‌سازی و تجزیه تحلیل مسائلی که در آن‌ها یک پاسخ مدّ نظر مفید است، تحت تأثیر چندین متغیر قرار گرفته و هدف، بهینه‌سازی این پاسخ است. جنبه مهم روش سطح پاسخ، طراحی آزمایش‌ها است که عموماً به‌عنوان<sup>۶</sup> (DOE) شناخته می‌شود. هدف طراحی آزمایش انتخاب نقاطی است که پاسخ باید ارزیابی شود. انتخاب طرح‌های آزمایش می‌تواند تأثیر زیادی بر روی صحت تخمین و هزینه ساخت مدار سطح پاسخ داشته باشد. سطح پاسخ به طراحی یک آزمایش تجربی می‌پردازد که تأثیرات چندگانه متغیرها را مدل‌سازی می‌کند [۱۶، ۱۷].

هدف اصلی این پژوهش، استفاده از امواج فراصوت در فرایند استخراج جامد - مایع و طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی عوامل مؤثر در استخراج نارینجین از پوست پرتقال در حلال

1. Carotenoids

2. Phenyl

3. Naringin

4. Biologically

5. Ultrasonic

6. Response surface methodology

7. Design of Experiments

تانول است. پارامترهای مؤثر بهینه‌شده در استخراج شامل pH، نسبت نمونه به حلال و زمان هستند. بازده استخراج در حلال اتانول با استفاده از آنالیز اسپکتروفوتومتری<sup>۱</sup>، برای اندازه‌گیری غلظت نارینجین در هر آزمایش و از آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)<sup>۲</sup> برای اندازه‌گیری درصد خلوص نارینجین در پودر به‌دست‌آمده از عصاره پوست پرتقال استفاده شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. ماده اولیه

میوه پرتقال تازه و رسیده و عاری از آلودگی، از باغ‌های کلاچای شرق گیلان - ایران تهیه شد. میوه‌ها با آب مقطر به‌صورت کاملاً بهداشتی شسته شدند تا هرگونه گردوغباری از سطح پوست میوه‌ها زدوده شود. سپس با دستمالی تمیز، کاملاً خشک شدند.

### ۲.۲. مواد شیمیایی

پودر نارینجین با خلوص  $> 98\%$  (سیگما آلدریج آلمان)، هیدروکلریک‌اسید  $37\%$  (مرک، آلمان)، محلول بافر

### ۲.۳. آماده‌سازی عصاره پوست پرتقال

پوست پرتقال‌ها از پالپ و بخش نارنجی‌رنگ نیز از غلاف داخلی جدا می‌شوند. سپس به‌مدت ۳ ساعت در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۹۰ در آن قرار می‌گیرند تا خشک شوند. به کمک ترازو، ۲۰ g پوست پرتقال خشک‌شده جدا و درون یک هاون تمیز ریخته می‌شود. پوست خشک‌شده در اثر کوبیدن مداوم کاملاً پودر می‌شود. سپس ۴۵۰ mL آب مقطر درون بشر ریخته و pH آن با هیدروکلریک‌اسید، به عدد ۵ رسانده و با استفاده از pH متر تنظیم می‌شود. با دستۀ هاون محلول را هم می‌زنیم تا یکنواخت شود. محلول به‌دست‌آمده به درون بشر ریخته می‌شود. در ادامه، با استفاده از ابزار استخراج اولتراسونیک، با توان ۳۰۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز، به‌مدت ۴۰ دقیقه در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۵۰ قرار گرفت. سپس محلول به داخل یک بطری پلاستیکی ریخته شد و درون فریزر در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۱۰- درجه قرار داده شد تا یخ بزند. شکل (۱) مراحل ساخت عصاره را نشان می‌دهد [۱۸].



شکل (۱) مراحل از تهیه عصاره پوست پرتقال و استخراج نارینجین

Fig 1. Steps of preparing orange peel extract and naringin extraction

<sup>1</sup> Spectrophotometry

<sup>2</sup> High Performance Liquid Chromatography



## ۴.۲. روش استخراج نارینجین

نمونه فریز شده بیرون آوردیم تا از حالت یخ‌زدگی به مایع تبدیل شود. ۱۰ mL حلال اتانول طبق طراحی آزمایش به درون بشر منتقل می‌شود. باتوجه به نسبت تعیین شده در هر آزمایش، نمونه به این ۱۰ mL حلال اتانول اضافه و pH با افزودن محلول بافر تنظیم می‌شود. بشر روی همزن قرار می‌گیرد تا حلال و نمونه مخلوط شوند. پارامتر زمان در هر آزمایش در نظر گرفته می‌شود. دمای مناسب برای آزمایش‌ها ۴۰ °C و ثابت است. پس از اتمام زمان تعیین شده، محلول موجود در بشر، از کاغذ صافی کربن عبور داده و درون فالکون<sup>۱</sup> ریخته می‌شود. سپس ۲ mL نارینجین با غلظت ۲/۱ mg/L به آن اضافه می‌شود که در شکل (۱) تمام این مراحل نشان داده شده است. در نهایت، داخل یخچال قرار می‌گیرد [۱۹].

## ۵.۲. تعیین خلوص نارینجین

محلول عصاره پوست پرتقال از دمای ۱۰ °C - فریزر خارج شده و در یخچال و دمای ۱۰ °C به مدت ۴۸ ساعت قرار می‌گیرد. سپس بطری حاوی عصاره پوست پرتقال از یخچال خارج شده و به مدت ۷۲ ساعت در محیطی با دمای ۲۵ °C + قرار می‌گیرد. پس از ۷۲ ساعت که عصاره در دمای محیط قرار گرفت، نارینجین به صورت پودر در کف بطری رسوب می‌کند. با استفاده از یک کیف و کاغذ صافی ۰/۴۵ μm، پودر از محلول جدا شد و در کاغذ صافی و در دمای ۶۵ °C، به مدت ۷۰ دقیقه باقی ماند تا پودر خشک شود. مراحل تشکیل پودر نارینجین در شکل (۲) مشاهده می‌شود. از HPLC (مدل Waters 2695، آشکارساز آرایه فتودیود Waters 996، طول موج ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر، ستون کروماتوگرافی ACE C18 (250 mm x 4.6 mm)، اندازه ذرات ۵ میکرومتر) برای جداسازی ترکیبات فعال زیستی استفاده شد [۲۰].

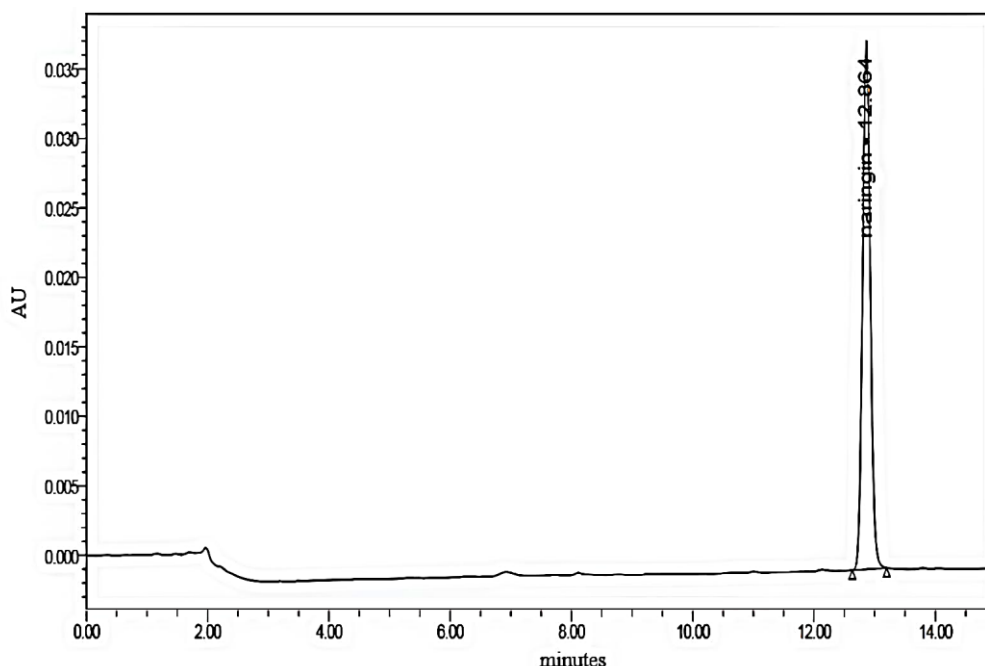


شکل (۲) پودر استخراج شده از عصاره پوست پرتقال  
Fig 2. Powder extracted from orange peel extract

## ۶.۲. آنالیز HPLC

روش HPLC شامل شست‌وشوی گرادیان، ۱۰ μL از هر عصاره تزریق و آنالیز در ۲۷۵ nm ارائه شد. شوینده‌های مورد استفاده استونیتریل (A) و آب (B) با سرعت جریان ۱ mL در دقیقه، با مشخصات شست‌وشوی گرادیان که از ۱۰٪ A شروع شده و در ۳۰ دقیقه به ۱۰۰٪ A و در ۳۶ دقیقه، به ۱۰٪ A می‌رسد.

دمای ستون در ۲۵ °C حفظ شد و پیک‌ها با مقایسه طیف UV-vis و زمان ماند با استانداردهای مرجع شناسایی شدند. نمونه‌ها دو بار برای صحت آنالیز شدند. با استفاده از آنالیز، HPLC خلوص نارینجین در پودر ۸۸/۲٪ اندازه‌گیری شد. شکل (۳) نمودار HPLC نارینجین در پودر به دست آمده از عصاره پوست پرتقال را نشان می‌دهد [۲۰].



شکل (۳) نمودار HPLC نارینجین در پودر به دست آمده از عصاره پوست پرتقال  
 Fig 3. HPLC diagram of naringin in powder obtained from orange peel extract

۲.۷. طراحی آزمایش  
 روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی عواملی که در استخراج نارینجین از پوست پرتقال نقش دارند، استفاده شد. در جدول (۱)، یک طرح مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل انتخاب شد: زمان (A)، pH (B) و نسبت نمونه به حلال (C). دامنه این متغیرها با استفاده از سطح پاسخ تعیین و در پنج سطح (۲، ۱، ۰، +۱، +۲) کدگذاری شدند. برای پارامتر pH مقادیر (۴، ۵، ۶، ۷، ۸) در نظر گرفته شد، پارامتر زمان (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰) پارامترهای مؤثر بهینه شدند. اهمیت آماری مدل با استفاده از آنالیز واریانس در سطح معناداری  $P=0.05$  ارزیابی شد.

جدول (۱) سطوح عوامل مؤثر در طراحی آزمایش  
 Table 1. Levels of influencing factors in experiment design

Factor	Name	Units	Minimum	Coded low	Mean	Coded high	Maximum
$\alpha$			-2	-1	0	+1	+2
A	Time	min	10	20	30	40	50
B	pH	-	4	5	6	7	8
C	Ratio	%	0,06	0,12	0,18	0,24	0,30



## ۳. بحث و نتایج

## ۳.۱. ساخت غلظت‌های استاندارد نارینجین

غلظت‌های استاندارد نارینجین با استفاده از پودر نارینجین در غلظت‌های (۱۰،۳۰،۵۰،۷۰،۱۰۰،۲۰۰ mg/L) ساخته و آنالیز اسپکتروفوتومتری انجام شد. منحنی استاندارد نارینجین با مدل خطی  $Y=0.153X+0.7045$  و ضریب همبستگی  $R^2=0.99$  رسم شد. برای تعیین مقدار نارینجین در عصاره پوست پرتقال در هر آزمایش، یک محلول نارینجین با غلظت ۲/۱ g/L ساخته می‌شود و مقدار ۲ mL از این محلول به نمونه اضافه شده و در سل<sup>۱</sup> موردنظر قرار می‌گیرد. سپس این سل در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار داده می‌شود که میزان جذب نارینجین در محدوده ۲۷۵ nm اندازه‌گیری می‌شود. در ادامه، عدد

جذب به دست آمده در هر آزمایش را در معادله خط منحنی‌های استاندارد نارینجین قرار داده و غلظت نارینجین محاسبه می‌شود. در جدول (۲) میزان استخراج نارینجین در هر آزمایش بررسی شده است. در جدول (۲) انتخاب کران‌های بهینه پارامترهای مؤثر در آزمایش، به دقت در طراحی آزمایش انتخاب و انجام شد. پارامتر pH (۴،۵،۶،۷،۸)، پارامتر زمان (۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰) دقیقه، پارامتر نسبت نمونه به حلال (۰/۳۰، ۰/۲۴، ۰/۱۲/۱۸، ۰/۱۰، ۰/۰۶) وارد طراحی آزمایش شد. برای محاسبه درصد استخراج (%R) در هر آزمایش، مقدار غلظت نارینجین در نمونه (C) را تقسیم بر غلظت کل نارینجین در نمونه خالص (Ct) می‌شود؛ سپس در عدد ۱۰۰ ضرب و معادله (۱) برای محاسبه بازده استخراج به کار می‌رود. [۲۳]

جدول (۲) طراحی آزمایش و بازده استخراج نارینجین در حلال اتانول

Table 2. Experiment design and extraction efficiency of naringin in ethanol solvent

Run	Ethanol	pH	Time(min)	Ratio	C (mg / L)	Efficiency(%)
1		8	30	0,18	110,06	77,05
2		4	30	0,18	74,82	52,38
3		6	30	0,30	114,09	79,87
4		6	10	0,18	124,19	86,94
5		5	20	0,12	103,81	72,67
6		7	20	0,12	115,79	81,06
7		6	30	0,18	113,45	79,42
8		7	20	0,24	120,39	84,28
9		6	30	0,06	107,31	75,12
10		6	50	0,18	109,12	76,39
11		7	40	0,12	123,12	86,19
12		6	30	0,18	118,16	82,72
13		5	20	0,24	109,95	76,97
14		6	30	0,18	119,53	83,68
15		7	40	0,24	123,75	86,63

<sup>1</sup>. Cell

16	6	30	0,18	118,36	82,86
17	5	40	0,24	87,49	61,25
18	6	30	0,18	112,25	78,58
19	5	40	0,12	98,12	68,69
20	6	30	0,18	112,72	78,91

$$(1) \%R = \frac{c}{c_t} \times 100$$

استخراج تأثیری ندارند. مقادیر P-values برای هر مدل در (جدول ۳) آورده شد. در حلال اتانول، برهم‌کنش زمان با نسبت نمونه به حلال (AC) و برهم‌کنش مجذور پارامترهای  $A^2$  و  $C^2$  و نیز برهم‌کنش پارامتر pH با نسبت نمونه به حلال (BC) بیشتر از ۰,۰۵ است که نشان‌دهنده تأثیر کمتر در بازده استخراج است. در باقی پارامترها، مقادیر P-values کمتر از ۰,۰۵ بود که اهمیت و تأثیر آن‌ها را نشان می‌دهد. مقادیر F-values، برای مدل موردنظر ۲۷,۰۲ محاسبه و تعیین شد که نشان‌دهنده معنادار بودن مدل بود.

### ۲.۳. نتایج سطح پاسخ (RSM)

#### ۱.۲.۳. آنالیز واریانس (ANOVA)

تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس برای قابلیت جذب و بازده استخراج نارینجین با در نظر گرفتن پارامترهای زمان، نسبت نمونه به حلال، pH و حلال انجام شد (جدول ۳). مقادیر P-values برای تعیین اهمیت و تأثیر پارامترها محاسبه شد. مقادیر P-values کمتر از ۰,۰۵ نشان داد که پارامتر موردنظر برای بازده استخراج ضروری است؛ درحالی‌که مقادیر بالاتر از ۰,۰۵ نشان می‌دهد که پارامترها در بازده

جدول (۳) نتایج ANOVA در استخراج نارینجین با حلال اتانول

Table 3. ANOVA results in extracting naringin with ethanol solvent

Ethanol solvent					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	1360,57	9	151,17	27,02	< 0,0001
A-Time	69,39	1	69,39	12,40	0,0055
B-pH	727,92	1	727,92	130,11	< 0,0001
C-Ratio	6,28	1	6,28	1,12	0,31
AB	92,34	1	92,34	16,51	0,0023
AC	26,35	1	26,35	4,71	0,0551
BC	5,78	1	5,78	1,03	0,33
Residual	55,95	10	5,59		
Lack of Fit	29,63	5	5,93	1,13	0,44
Pure Error	26,32	5	5,26		
Cor Total	1416,52	19			

مقادیر برقرار است. نسبت سیگنال<sup>۱</sup> به نویز<sup>۲</sup> که دقت مدل ها را تعیین می‌کند، برای حلال اتانول ۲۰/۶۹ محاسبه شد؛ نسبتی بالاتر از ۴ را نمایش می‌دهد که مناسب است و می‌توان از مدل‌ها به‌طور مؤثر در فضای طراحی استفاده کرد. جدول (۴) نشان می‌دهد مدل موردنظر برای پیش‌بینی رفتار فرایند استخراج مناسب است.

### ۳.۲.۲. دقت کافی و مناسب مدل.

مقدار ضریب همبستگی که تناسب بین نتایج تجربی و محاسبه‌شده را اندازه‌گیری می‌کند، در حلال اتانول بالاتر از ۰/۸ است که نشان‌دهنده برآزش خوب است. مقادیر ضریب همبستگی پیش‌بینی‌شده و ضریب همبستگی تنظیم‌شده محاسبه و در (جدول ۴) ثبت شد که تناسب خوبی بین این

جدول (۴) دقت کافی و ضریب همبستگی واقعی با ضریب همبستگی محاسبه‌شده در آزمایش

Table 4. Sufficient accuracy and true regression coefficient with the regression coefficient calculated in the experiment

Ethanol solvent		Ethanol solvent	
Std. Dev.	2,37	R <sup>2</sup>	0,96
Mean	77,58	Adjusted R <sup>2</sup>	0,92
C.V. %	3,05	Predicted R <sup>2</sup>	0,81
		Adeq Precision	20,69

نمونه به حلال و pH معادله سطح حلال اتانول معادله (۲) با استفاده از پارامترهای کدگذاری‌شده تعیین می‌شود. این معادلات درجه دو هستند و با تنظیم شرایطی مانند زمان، نسبت نمونه به حلال و pH می‌توان مقدار پاسخ را به حداکثر رساند.

$$\text{حلال اتانول} = +81.21 - 2.08A + 6.75B + 0.6263C + 3.40AB - 1.82AC + 0.85BC \quad (2)$$

نرمال را نشان می‌دهد. نتایج مربوط به راندمان استخراج در شکل (۴-A)، نشان می‌دهد که داده‌های حلال اتانول به توزیع نرمال پای‌بند هستند. برای تأیید واریانس ثابت، نمودار توزیع باقیمانده‌ها با مقادیر پیش‌بینی‌شده مقایسه می‌شود. اگر الگو یا روند قابل تشخیصی وجود نداشته باشد، می‌توان نتیجه گرفت که واریانس ثابت است. در شکل (۴-B)، الگوی واضحی نشانگر واریانس ثابت و تأیید مناسب بودن مدل است. نتایج تجربی بر روی محورهای افقی ترسیم شده که نشان‌دهنده مناسب بودن داده‌های تجربی است.

### ۳.۲.۳. معادله رویه سطح

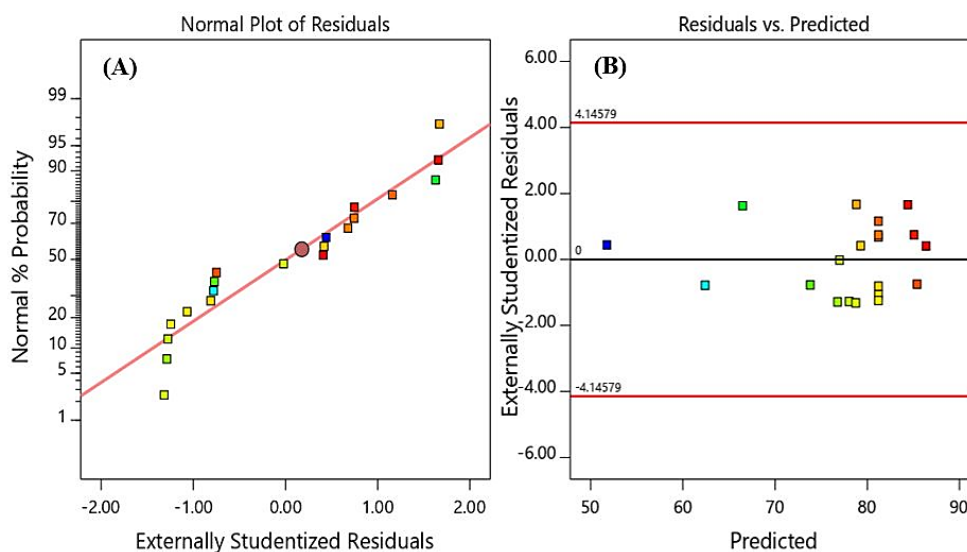
روش سطح پاسخ برای ایجاد معادلاتی استفاده می‌شود که رابطه بین پارامترهای تأثیرگذار در یک آزمون بر پاسخ را توصیف می‌کند [۲۴-۲۵]. در این حالت، اثر زمان، نسبت

### ۳.۲.۴. تجزیه و تحلیل نمودارهای سطح پاسخ

تجزیه و تحلیل آزمایش‌ها و استفاده از مدل‌های خطی، با دو فرض انجام می‌شود. فرض اول این است که باقیمانده‌ها دارای توزیع نرمال با میانگین صفر هستند و فرض دوم ثابت بودن واریانس است. اگر این مفروضات درست باشد، مدل انتخابی قابل قبول و معتبر تلقی می‌شود. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌های تجربی، از نمودار احتمال نرمال استفاده می‌شود، با نقاطی که از یک خط مستقیم پیروی می‌کنند که توزیع

1. Signal

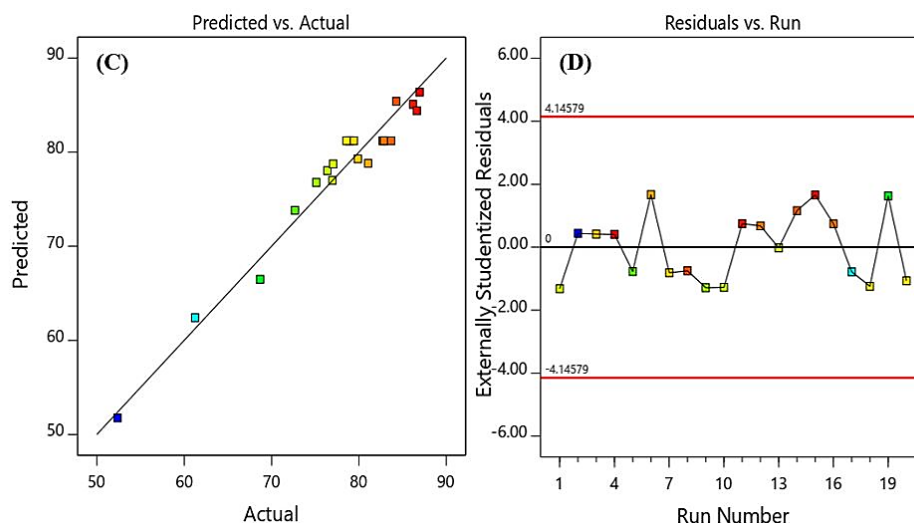
2. Noise



شکل (۴) نمودار داده‌های نرمال برای حلال اتانول (A)، نمودار پراکندگی باقی‌مانده‌های پیش‌بینی‌شده حلال اتانول (B)  
**Fig 4.** Normal plot of residuals for ethanol solvent (A), scatter plot of predicted ethanol solvent residues (B)

بیان‌گر عملکرد معین و پراکندگی داده‌های قابل قبول است. در شکل (۵-D)، نمودار باقی‌مانده‌ها را نسبت به متغیرهای واقعی رسم می‌کند و پراکندگی نمودار باید از الگوی خاصی پیروی نکند.

در شکل (۵-C)، مربع‌ها کمیته‌های تجربی و خطوط نشان‌دهنده مقادیر پیش‌بینی‌شده هستند. هرچه مربع‌ها به خطوط نزدیک‌تر باشند، پراکندگی نتایج تجربی کمتر است. در این حالت، بازده استخراج در حلال اتانول، همان‌طور که در ارزیابی‌ها اندازه‌گیری می‌شود، نزدیک به خط است که

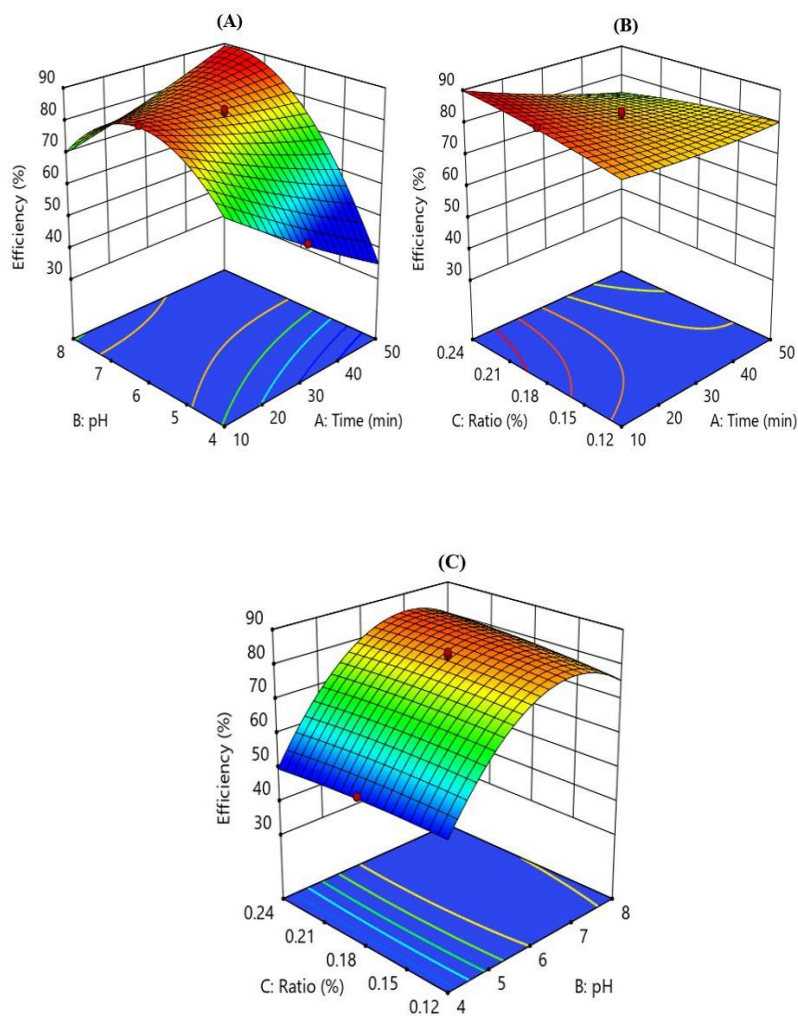


شکل (۵) نمودارهای ایده‌آل مقادیر پاسخ پیش‌بینی‌شده با مقادیر واقعی پاسخ‌ها برای حلال اتانول (C)، نمودارهای باقی‌مانده نسبت به متغیرهای واقعی برای حلال اتانول (D)  
**Fig 5.** Ideal charts of predicted response values versus actual response values for the solvent ethanol (C), Plots of residuals versus actual variables for the ethanol solvent (D)

و در زمان‌های اولیه، بازده استخراج نیز افزایش می‌یابد. در شکل ۶-۳، تغییرات بازده استخراج با قرار گرفتن پارامتر زمان در نقطه میانی ۳۰ دقیقه مشاهده می‌شود. با صعود پارامتر pH تا میانی ۶٫۵-۷، بازده افزایش می‌یابد و با رشد پارامتر نسبت نمونه به حلال در همان مقدار اولیه، بازده استخراج نیز بین ۵۲٫۳۸ تا ۸۶٫۹۴٪ رشد می‌کند.

### ۳.۲.۵. نمودارهای سه‌بعدی جذب و استخراج نارینجین

برای حلال اتانول در شکل ۶-۴، مقدار نسبت نمونه به حلال ثابت ۰٫۱۸ فرض شده است که با کاهش پارامتر زمان و قرار گرفتن pH در نقطه ۶-۷، بازده استخراج افزایش می‌یابد. در شکل ۶-۵، پارامتر pH در نقطه میانی ۶ قرار دارد



شکل (۶) نمودارهای سه‌بعدی تعامل پارامترها و جذب نارینجین در حلال اتانول (C,B,A)

Fig 6. 3D diagrams of the interaction of parameters and absorption of naringin in ethanol solvent (A,B,C)

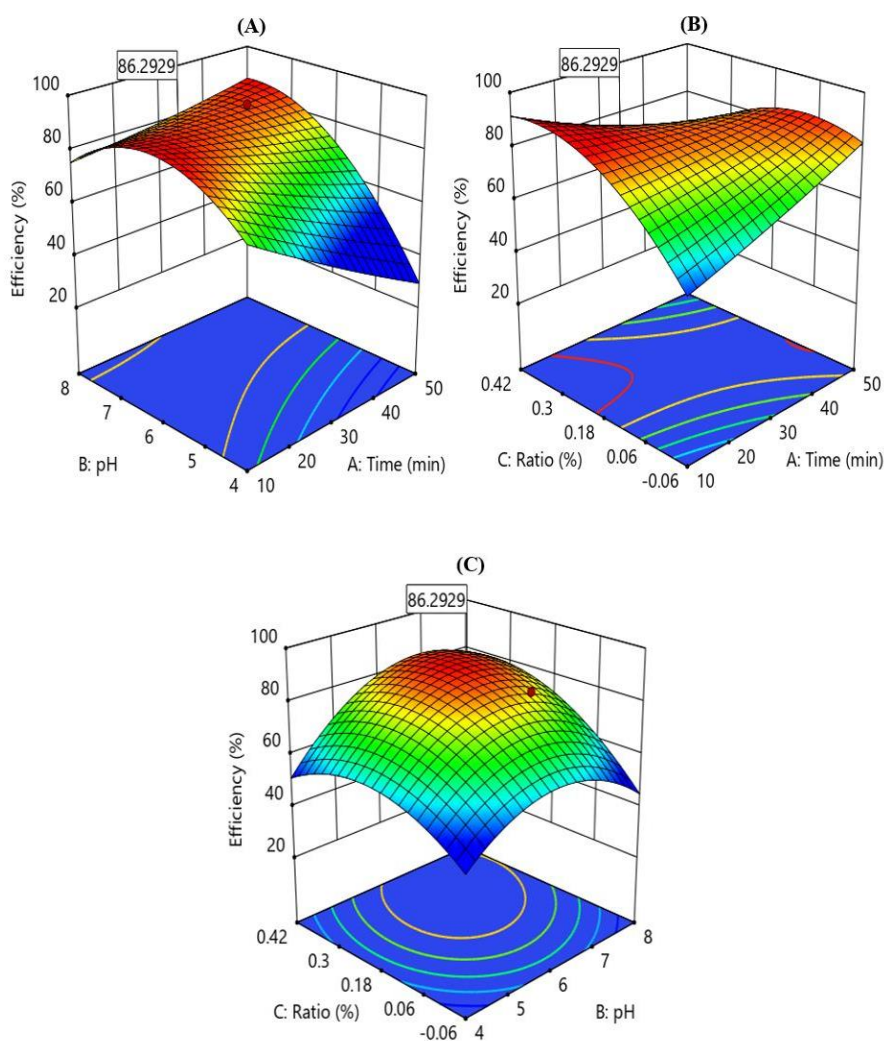
در نقطه ۵-۷ بازده استخراج به حداکثر میزان خود، یعنی ۸۶٪ می‌رسد.

در شکل ۷-B، پارامتر pH در نقطه ۶٫۵ قرار دارد که با افزایش پارامتر زمان و پارامتر نسبت نمونه به حلال، بازده استخراج به حداکثر میزان خود می‌رسد.

در شکل ۷-C، پارامتر زمان در نقطه ۲۰ دقیقه قرار دارند و با قرارگرفتن پارامتر pH در نقطه میانی ۶-۷ و افزایش پارامتر نسبت نمونه به حلال در نقطه ۰٫۲۴، بازده استخراج به حداکثر میزان می‌رسد.

### ۳.۲.۶. بهینه‌سازی نمودارهای سه‌بعدی در استخراج نارینجین

روش سطح پاسخ شرایط عملیاتی بهینه و مطلوبیت را برای حداکثر بازده استخراج نارینجین در حلال اتانول تعیین کرد [۱۶]. پس از بهینه‌سازی پارامترهای استخراج در حلال اتانول در (شکل ۷-A) پارامتر نسبت نمونه به حلال ثابت است و با افزایش پارامتر زمان و قرارگرفتن پارامتر pH



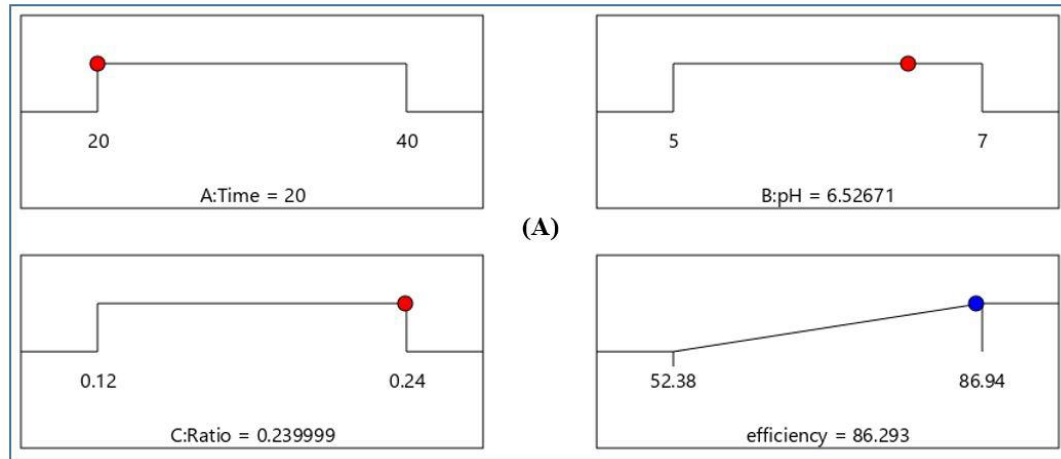
شکل (۷) بهینه‌سازی پارامترهای استخراج و نمودار سه‌بعدی با ثابت‌گرفتن پارامترها در نقطه میانی برای حلال اتانول (C·B·A)

Fig 7. Optimization of extraction parameters and 3D plot by fixing parameters at the midpoint for ethanol solvent (A·B·C)

بهینه برای حلال اتانول در شکل (۸) A، شامل  $\text{pH} = 6.5$ ، زمان ۲۰ دقیقه، نسبت نمونه به حلال ۰/۲۴ و بازده استخراج نارینجین ۸۶/۲٪ و میزان استخراج نارینجین ۱۲۳ mg/L است.

### ۳.۲.۷. بهینه‌سازی پارامترهای استخراج

برای دستیابی به حداکثر بازده استخراج نارینجین در حلال اتانول، اثرات  $\text{pH}$ ، زمان، نسبت نمونه به حلال با استفاده از طرح مرکب مرکزی، محاسبه و بررسی شد [۱۷].



شکل (۸) بهینه‌سازی پارامترهای استخراج حلال اتانول (A)

Fig 8. Optimization of ethanol solvent extraction parameters (A)

اصلی شناسایی و کمی‌سازی شده‌اند. مقادیر به‌دست‌آمده برای این ترکیبات چنین است: نارینجین  $5.1 \pm 0.4$ ، نئوهسپریدین  $7.9 \pm 0.8$ ، ناریروتین  $26.9 \pm 2.1$  هسپریدین  $35.2 \pm 3.6$  mg/g.

پنج روش مختلف استخراج برای بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولی از پوست پرتقال بررسی شد. پارامترهای تحلیلی دقت و تکرارپذیری روش مویرگی-یون‌سنجی-طیف‌سنجی جرمی بررسی شد و نتایج نشان‌دهنده دقت مناسب و قابلیت تکرار بالا در اندازه‌گیری ترکیبات فنولی بود [۲۶]. لونگو و همکاران در سال ۲۰۱۲، به بررسی تأثیر استفاده از میدان‌های الکتریکی پالس‌دار بر استخراج پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها (نارینجین و هسپریدین) از پوست پرتقال پرداختند. نتایج نشان داد که استفاده از میدان‌های الکتریکی پالس‌دار به‌عنوان یک فناوری ملایم می‌تواند به بهبود استخراج پلی‌فنول‌ها از پوست پرتقال کمک کند و درعین حال ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را افزایش دهد. در این بررسی، میدان‌های الکتریکی پالس‌دار، باعث افزایش قابل‌توجهی در استخراج پلی‌فنول‌ها از پوست پرتقال می‌شود. این فناوری به‌ویژه در کاهش زمان استخراج و عدم‌نیاز به حلال‌های آلی

### ۳.۳. بررسی و مقایسه پژوهش‌های پیشین در استخراج نارینجین

ساوالا و همکاران در سال ۲۰۰۹، به بررسی و شناسایی ترکیبات فنولی اصلی در پوست پرتقال‌های شیرین و تلخ با استفاده از روش الکتروفورز مویرگی-یون‌سنجی-طیف‌سنجی جرمی پرداختند. ترکیبات فنولی و خواص آن‌ها ترکیبات فنولی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته می‌شوند و در میوه‌ها، سبزیجات و دیگر مواد گیاهی به وفور یافت می‌شوند. پوست پرتقال به‌عنوان منبع غنی از فلاونوئیدها، به‌ویژه در فراوری پرتقال، مورد توجه قرار گرفته است.

پوست پرتقال تقریباً ۳۰٪ از جرم میوه را تشکیل می‌دهد و غلظت بالای فلاونوئیدها در آن وجود دارد. این ترکیبات دارای خواص سلامتی از جمله فعالیت‌های ضدسرطانی، ضدویروسی و ضدالتهاپی هستند. روش‌های تحلیلی استفاده از الکتروفورز مویرگی، به‌عنوان یک روش تحلیلی با دقت بالا و نیاز به حجم کم نمونه، جایگزین یا مکملی برای روش‌های کروماتوگرافی مرسوم معرفی کرده‌اند. شناسایی و کمی‌سازی ترکیبات در این مطالعه، نارینجین، نئوهسپریدین، ناریروتین و هسپریدین، به‌عنوان ترکیبات



مؤثر است. افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست‌آمده از پوست پرتقال تحت درمان میدان‌های الکتریکی پالس‌دار دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری هستند که به‌دلیل افزایش محتوای پلی‌فنول‌ها در این عصاره‌ها است. تأثیر بر ترکیبات اصلی تأثیر منفی بر کیفیت فلاونوئیدها نداشته و باعث افزایش استخراج نارینجین و هسپریدین می‌شود. با استفاده از میدان‌های الکتریکی پالس‌دار در میدان‌های الکتریکی ۱، ۳، ۵ و ۷ کیلوولت بر سانتی‌متر، بازده استخراج پلی‌فنول‌ها به ترتیب ۲۰٪، ۱۲۹٪، ۱۵۳٪ و ۱۵۹٪ افزایش یافت. بالاترین بازده استخراج کل پلی‌فنول‌ها به  $34.80 \text{ mg}$  معادل اسیدگالیک در هر ۱۰۰ g پوست تازه پرتقال رسید. مقدار نارینجین از ۱ به  $3.1 \text{ mg}$  و هسپریدین از  $1.3$  به  $4.6 \text{ mg}$  در هر ۱۰۰ g پوست پرتقال افزایش یافت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با افزایش میدان الکتریکی به ترتیب ۵۱٪، ۹۴٪، ۱۴۸٪ و ۱۹۲٪ نسبت به نمونه‌های بدون درمان افزایش یافت. این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل میدان‌های الکتریکی پالس‌دار به‌عنوان یک روش کارآمد و دوست‌دار محیط‌زیست برای استخراج ترکیبات مفید از پوست پرتقال است [۲۷]. پریرا و همکاران در سال ۲۰۱۷، به بررسی و تحلیل محتوای فلاونوئیدها در پوست پرتقال‌های مختلف برزیلی و ضایعات فراوری آب پرتقال پرداختند. محتوای فلاونوئیدها این مطالعه نشان می‌دهد که فلاونوئیدهای موجود در پوست پرتقال‌ها، به‌ویژه هسپریدین و نارینجین، در مقادیر بالاتری نسبت به آب پرتقال‌ها وجود دارند. در پوست پرتقال مقدار هسپریدین  $41.17 \text{ mg/g}$  و نارینجین  $2.06 \text{ mg}$  گزارش کرده‌اند. از روش‌های مختلفی برای استخراج فلاونوئیدها استفاده شده است، از جمله هگزان و متانول. تحلیل آماری استفاده از تحلیل‌های چندمتغیره، برای بررسی و تفکیک ترکیبات شیمیایی و روش‌های استخراج به کار رفته است. فلاونوئیدها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در مرکبات، تأثیرات قابل‌توجهی بر روی سلامتی انسان دارند و خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی دارند [۲۸]. پالیم و همکاران در سال ۲۰۲۰، به بررسی ترکیب نارینجین در آب‌میوه‌های پرتقال ترکیه و فرایند کاهش تلخی آن با استفاده از آنزیم نارینجیناز پرداختند. تولید پرتقال در ترکیه یکی از تولیدکنندگان اصلی پرتقال در جهان است و آب‌میوه‌سازی از

این میوه‌ها به‌دلیل تلخی ناشی از نارینجین اهمیت دارد. مقدار نارینجین در این مطالعه، غلظت نارینجین در ۹۷ نمونه آب‌میوه تازه و ۳۰ نمونه آب‌میوه تجاری اندازه‌گیری شد. غلظت نارینجین در آب‌میوه‌های تازه بین  $0.12$  تا  $2.63 \text{ mg/L}$  و در آب‌میوه‌های تجاری بین  $0.61$  تا  $19.4 \text{ mg/L}$  متغیر بود. کاهش نارینجین با استفاده از نارینجیناز،  $3/3$ ٪ از نارینجین در طی ۸۵ دقیقه هیدرولیز شد. تلخی نارینجین به‌عنوان یک گلیکوزید فلاونوئیدی، عامل اصلی تلخی در میوه‌های مرکبات است و کاهش آن به‌منظور بهبود کیفیت و ارزش تجاری آب‌میوه‌ها ضروری است. روش‌های کاهش تلخی روش‌های مختلفی برای کاهش تلخی وجود دارد، از جمله استفاده از نارینجیناز که از قارچ‌ها استخراج می‌شود. این آنزیم نارینجین را به نارینجین تبدیل می‌کند که تلخی ندارد [۲۹].

#### ۴. نتیجه‌گیری

پوست پرتقال حاوی ماده دارویی ارزشمند با خواص ضدسرطانی نارینجین است. روش سطح پاسخ برای تجزیه و تحلیل عوامل و برهم‌کنش آن‌ها استفاده شد. برای استخراج نارینجین از پوست پرتقال، فرایند استخراج و امواج فراصوت با استفاده از حلال اتانول مؤثر و مناسب است. سه پارامتر (زمان، pH و نسبت نمونه به حلال) تأثیر قابل‌توجهی بر بازده استخراج نارینجین داشتند. مدل ریاضی یک همبستگی بیش از ۹۶٪ نشان داد که می‌توان از یک مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای بهینه‌سازی استخراج نارینجین از پوست پرتقال استفاده کرد. بهترین شرایط برای به‌دست‌آوردن بالاترین بازده و حداکثر استخراج نارینجین در حلال اتانول ۹۶٪، دمای  $40^\circ \text{C}$  و نسبت نمونه به حلال  $0.24$ ، زمان ۲۰ دقیقه و  $\text{pH} = 6.5$ ،  $123.2 \text{ mg/L}$  تعیین شد. مقادیر تجربی به‌دست‌آمده در این شرایط بهینه با مقادیر پیش‌بینی‌شده مطابقت داشت. میزان خلوص پودر استخراج‌شده از عصاره پوست پرتقال  $2/88$ ٪ بود. علاوه بر این، استفاده از غلظت اتانول ۹۶٪ منجر به استخراج بیشتر نارینجین در مدت‌زمان کمتر می‌شود. در حلال اتانول، محیط اسیدی بسیار ضعیف و نزدیک به خنثی در استخراج نارینجین تأثیرگذار است.



### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان بیان نشده است.

به‌خاطر فراهم‌آوردن امکانات لازم برای انجام این پژوهش، ابراز می‌دارند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس‌گزاری خود را از گروه مهندسی شیمی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه گیلان،

### فهرست نمادها

علامت	نام لاتین	نام فارسی
UV	Ultra-violet radiation	اشعه فرابنفش
CCD	Central composite design	طراحی مرکب مرکزی
RSM	Response surface methodology	روش سطح پاسخ
DOE	Design of Experiments	طراحی آزمایش
C <sub>0</sub> (mg/L)	Initial concentration	غلظت اولیه
C <sub>t</sub> (mg/L)	Total concentration	غلظت کل
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

### مراجع

- [1] Ozturk, B., Winterburn, J., & Gonzalez-Miquel, M. (2019). Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 107298. doi:10.1016/j.bej.2019.107298
- [2] Panić, M., Stojković, M. R., Kraljić, K., Škevin, D., Redovniković, I. R., Srček, V. G., & Radošević, K. (2019). Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chemistry*, 283, 628–636. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.061
- [3] Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Dhyani, A., Pathak, B., Jang, H., Cho, S. (2021). Biotransformation of citrus Waste-I: production of biofuel and valuable compounds by fermentation. *Processes*, 9(2), 220. doi:10.3390/pr9020220
- [4] Murador, D. C., Salafia, F., Zoccali, M., Martins, P. L. G., Ferreira, A. G., Dugo, P., Giuffrida, D. (2019). Green Extraction Approaches for Carotenoids and Esters: Characterization of Native Composition from Orange Peel. *Antioxidants*, 8(12), 613. doi:10.3390/antiox8120613
- [5] Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanana, N., & Chemat, F. (2015). 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. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.11.015

- [6] Jokić, S., Molnar, M., Cikoš, A., Jakovljević, M., Šafranko, S., & Jerković, I. (2019). Separation of selected bioactive compounds from orange peel using the sequence of supercritical CO<sub>2</sub> extraction and ultrasound solvent extraction: optimization of limonene and hesperidin content. *Separation Science and Technology*, 55(15), 2799–2811. doi:10.1080/01496395.2019.1647245
- [7] Obafaye, R. O., & Omoba, O. S. (2018). Orange peel flour: A potential source of antioxidant and dietary fiber in pearl-millet biscuit. *Journal of Food Biochemistry*, 42(4), e12523. doi:10.1111/jfbc.12523
- [8] Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and vegetable waste: bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512–531. doi:10.1111/1541-4337.12330
- [9] Saleem, M., & Saeed, M. T. (2020). Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 805–810. doi:10.1016/j.jksus.2019.02.013
- [10] Viñas-Ospino, A., Panić, M., Bagović, M., Radošević, K., Esteve, M., & Redovniković, I. R. (2023). Green approach to extract bioactive compounds from orange peel employing hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 31, 100942. doi:10.1016/j.scp.2022.100942
- [11] Ravetti, S., Garro, A. G., Gaitán, A., Murature, M., Galiano, M., Brignone, S. G., & Palma, S. D. (2023). Naringin: Nanotechnological Strategies for Potential Pharmaceutical Applications. *Pharmaceutics*, 15(3), 863. doi:10.3390/pharmaceutics15030863
- [12] Bubalo, M. C., Vidović, S., Redovniković, I. R., & Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioprocess Processing*, 109, 52–73. doi:10.1016/j.fbp.2018.03.001
- [13] Csuti, A., Sik, B., & Ajtony, Z. (2022). Measurement of Naringin from Citrus Fruits by High-Performance Liquid Chromatography – a Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–14. doi:10.1080/10408347.2022.2082241
- [14] Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303–313. doi:10.1016/s1350-4177(01)00071-2
- [15] Munekeata, P. E., Alcántara, C., Žugčić, T., Abdelkebir, R., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Lorenzo, J. M. (2020). Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. *Food Research International*, 134, 109242. doi:10.1016/j.foodres.2020.109242
- [16] Setyani, W., Murwanti, R., Sulaiman, T. N. S., & Hertiani, T. (2023). Application of Response Surface Methodology (RSM) for the Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) of *Moringa oleifera*: Extraction Yield, Content of Bioactive Compounds, and Biological Effects In Vitro. *Plants*, 12(13), 2455. doi:10.3390/plants12132455
- [17] Melgar, B., Dias, M. I., Barros, L., Ferreira, I. C., Rodriguez-Lopez, A. D., & Garcia-Castello, E. M. (2019). Ultrasound and microwave assisted extraction of opuntia fruit peels biocompounds: Optimization and comparison using RSM-CCD. *Molecules*, 24(19), 3618. doi:10.3390/molecules24193618
- [18] Dalmau, E., Rosselló, C., Eim, V., Ratti, C., & Simal, S. (2020). Ultrasound-Assisted Aqueous Extraction of Biocompounds from Orange Byproduct: Experimental Kinetics and Modeling. *Antioxidants*, 9(4), 352. doi:10.3390/antiox9040352
- [19] González-Centeno, M. R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., & Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.):



Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506–514.

doi:10.1016/j.ultsonch.2014.05.027

[20] Stabrauskiene, J., Marksa, M., Ivanauskas, L., & Bernatoniene, J. (2022). Optimization of Naringin and Naringenin Extraction from Citrus × paradisi L. Using Hydrolysis and Excipients as Adsorbent. *Pharmaceutics*, 14(5), 890.

doi:10.3390/pharmaceutics14050890

[21] Chemat, F., Vian, M. A., Fabiano-Tixier, A., Nutrizio, M., Jambak, A. R., Munekata, P., Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 22(8), 2325–2353. doi:10.1039/c9gc03878g

[22] Kanmani, P., Dhivya, E., Aravind, J., & Kumaresan, K. (2014). Extraction and Analysis of Pectin from Citrus Peels: Augmenting the Yield from Citrus limon Using Statistical Experimental Design. *Iranica Journal of Energy and Environment*, 5(3).

doi:10.5829/idosi.ijee.2014.05.03.10

[23] Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A. (2014). Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 122, 323–330.

doi:10.1016/j.seppur.2013.10.040

[24] Chakraborty, S., Uppaluri, R., & Das, C. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter melon using response surface methodology (RSM). *Food and Bioprocess Technology*, 120, 114–122.

doi:10.1016/j.fbp.2020.01.003

[25] Renu, R., Waghay, K., & Reddy, P. D. S. (2022). Standardization and modelling of storage conditions for Hydro-Cooling of mango (*Mangifera indica*) using response surface methodology. Research Square (Research Square). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1465013/v1>

[26] Sawalha, S. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chemistry*, 116(2), 567–574.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.003>

[27] Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2012). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 79–84.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.005>

[28] Pereira, R. M. S., López, B. G., Diniz, S. N., Antunes, A. A., Garcia, D. M., Oliveira, C. R., & Marcucci, M. C. (2017). Quantification of flavonoids in Brazilian orange peels and industrial orange juice processing wastes. *Agricultural Sciences*, 08(07), 631–644.

<https://doi.org/10.4236/as.2017.87048>

[29] Yalim, S., Özdemir, Y., & Ekiz, H. (2020). Naringin in Turkish orange juices and its reduction by Naringinase. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(3).

<https://doi.org/10.38212/2224-6614.2642>