



Comparison of hydrodistillation method and headspace single drop microextraction method (HS-SDME) using deep eutectic solvents to identify apple essential oil compounds

Marzieh Babashpour-Asl^{1*} and Marzieh Piryaee²

1*. Corresponding Author, Department of Horticultural Science, Mar.C., Islamic Azad University, Maragheh, Iran, E-mail: babashpour@gmail.com

2. Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

Received: November 2024

Revised: May 2025

Accepted: May 2025

Abstract

Background and objectives: *Malus domestica* Borkh. 'Red delicious' is one of the most economically significant fruit crops cultivated worldwide, including in Iran, with its aroma arising from a complex mixture of volatile compounds that define its sensory profile and vary across species and cultivars. Deep eutectic solvents (DESs) represent an innovative class of solvents distinguished by their non-flammability, negligible volatility, low vapor pressure, thermal stability, biodegradability, minimal toxicity, and reusability, excelling in extracting bioactive compounds while preserving their structural and functional integrity while also serving dual roles as reaction media and catalysts in organic synthesis to enhance bioavailability. Headspace single-drop microextraction (HS-SDME) is a highly efficient technique for analyzing volatile and semi-volatile compounds, eliminating matrix interference with minimal solvent use, making it ideal for essential oil extraction.

Methodology: This study developed an HS-SDME method for extracting apple essential oils using newly designed DESs, followed by GC/MS analysis, with key parameters, including DES composition, drop volume, sample weight, extraction temperature, and time, systematically optimized, evaluating three DESs composed of choline chloride paired with ethylene glycol, phenol, or 4-chlorophenol as hydrogen bond donors, and comparing the results with conventional hydrodistillation (HD) using a Clevenger apparatus.

Results: Among the tested solvents, the combination of choline chloride and 4-chlorophenol demonstrated the highest extraction efficiency for the target analytes. Several experimental parameters influencing the efficiency of essential oil extraction using the DESs-HS-SDME method were optimized as follows: a eutectic solvent volume of 3 mL, an extraction time of 50 minutes, an extraction temperature of 80 °C, and a sample weight of 3 g. Using the DESs-HS-SDME method, 22 compounds were isolated from apple essential oil, consistent with the results obtained from the HD method. Of these compounds, 76% were monoterpenes, including α -thujene, α -pinene, camphene, sabinene, β -pinene, myrcene, α -phellandrene, *p*-cymene, β -phellandrene, *Z*- β -ocimene, *E*- β -ocimene, γ -terpinene, terpinolene, α -pinene oxide, trans-sabinene hydrate, cis-verbenol, neo-3-thujanol, carvacrol ethyl ether, and terpinen-4-ol acetate.



Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (<http://ijmapr.areeo.ac.ir/>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Additionally, 20% were sesquiterpenes, comprising bicyclogermacrene, (*E,E*)- α -farnesene, germacrene B, spathulenol, and epi-cedrol. Notably, α -phellandrene, α -pinene, β -pinene, sabinene, and *p*-cymene were the most predominant compounds in both analytical methods employed.

Conclusion: In this study, an analytical procedure was proposed for the first time for extracting essential oil from apple fruit using headspace single-drop microextraction (HS-SDME) with deep eutectic solvents (DESs). Unlike previous studies, which employed conventional solvents for HS-SDME, this work introduces DESs as a greener and more effective alternative. The DESs-HS-SDME method provides an environmentally friendly, simple, and efficient approach for essential oil extraction from apple fruit. Given their low toxicity, biodegradability, and tunable properties, DESs show great promise as suitable extraction media for isolating volatile compounds from natural samples using HS-SDME.

Key Words: Volatile oils, green solvent, modern technique of extraction, apple odor.

مقایسه روش تقطیر با آب و روش میکرواستخراج با تک قطره در فضای فوقانی (HS-SDME) با استفاده از حلال‌های اتکتیک عمیق برای شناسایی ترکیبات اسانس میوه سیب

مرضیه باباشپور اصل^{۱*} و مرضیه پیریایی^۲

^{۱*} - نویسنده مسئول، دانشیار، گروه باغبانی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران، پست الکترونیک: babashpour@gmail.com

^۲ - دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۴

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: سیب قرمز (*Malus domestica* Borkh. "Red delicious") یکی از مهمترین محصولات میوه‌ای است که در نقاط مختلف جهان، از جمله ایران کشت می‌شود. عطر میوه، ترکیبی پیچیده از تعداد زیادی ترکیبات فرار است که نقش حیاتی در تعیین ویژگی‌های حسی منحصر به فرد میوه دارد و این ویژگی‌ها بین گونه‌ها و ارقام مختلف متفاوت است. حلال‌های اتکتیک به عنوان نوع جدیدی از حلال‌ها محسوب می‌شوند که غیرقابل اشتعال، غیرفرار، دارای فشار بخار پایین، پایداری حرارتی مناسب، تجزیه پذیر در محیط زیست، سمیت کم و امکان استفاده دوباره هستند. استخراج ترکیبات زیست فعال از منابع طبیعی می‌تواند به صورت کارآمدی با استفاده از حلال‌های اتکتیک عمیق انجام شود که خواص ساختاری و عملکردی این ترکیبات را به طور کامل حفظ می‌کنند. علاوه بر قابلیت‌های استخراجی، این حلال‌ها به عنوان محیط واکنش و کاتالیزور در شیمی آلی نیز نقش دوگانه‌ای ایفا می‌کنند و به طور همزمان زیست‌فراهمی محصولات طبیعی را افزایش می‌دهند. همچنین، این حلال‌ها در کاربردهای آنالیز نیز بسیار متنوع هستند و به عنوان فازهای متحرک و ثابت در جداسازی کروماتوگرافی و آنالیز ترکیبات طبیعی استفاده می‌شوند. تکنیک میکرواستخراج با تک قطره در فضای فوقانی (Head-Space Single Drop Micro-Extraction) روشی بسیار عالی برای تجزیه ترکیبات فرار و نیمه فرار در ماتریس‌های مختلف است؛ زیرا هیچ گونه تداخلی با ماتریس نمونه ایجاد نمی‌کند. همچنین این تکنیک برای شناسایی ترکیبات آروماتیک فرار به میزان بسیار کمی حلال نیاز دارد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، تکنیک HS-SDME برای استخراج اسانس میوه سیب با استفاده از حلال‌های اتکتیک عمیق (DESSs) طراحی و توسعه داده شد و بعد با استفاده از دستگاه GC/MS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پارامترهای کلیدی فرایند DESS-HS-SDME شامل نوع حلال اتکتیک، حجم قطره، وزن نمونه، دما و زمان استخراج بهینه‌سازی شد. سه نوع حلال اتکتیک عمیق مختلف شامل کولین کلراید (به عنوان پذیرنده پیوند هیدروژنی)، در ترکیب با اتیلن گلیکول، فنول و ۴-کلروفنول (به عنوان دهنده پیوند هیدروژنی)، تهیه و ارزیابی شد. در نهایت ترکیبات اسانس میوه سیب به دست آمده با این روش، با ترکیبات اسانس به دست آمده با روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر مقایسه گردید.

نتایج: از میان حلال‌های آزمایش شده، ترکیب کولین کلراید، ۴-کلروفنول بالاترین بازدهی استخراج را برای آنالیت‌های هدف نشان داد. برخی پارامترهای آزمایشی مؤثر در کارایی استخراج اسانس توسط روش DESS-HS-SDME به ترتیب زیر بهینه‌سازی شدند، حجم حلال اتکتیک ۳ میلی لیتر، زمان استخراج ۵۰ دقیقه، دمای استخراج ۸۰ درجه سانتی گراد و وزن نمونه ۳ گرم. در روش DESS-HS-SDME، ۲۲ ترکیب از اسانس سیب استخراج شد که با نتایج به دست آمده از روش تقطیر با آب (HD) مطابقت داشت. از این ترکیبات ۷۶ درصد ترکیبات منوترین (آلفا-توجن، آلفا-پینن، کامفن، ساینن، بتا-پینن، میرسن، آلفا-فلاندرن، پارا-سیمن، بتا-فلاندرن، سیس-بتا-اوسیمن، ترانس-بتا-اوسیمن، گاما-ترپینن، ترینولن، آلفا-پینن اکساید، ترانس-ساینن هیدرات، سیس-وربنول، نتو-توجان-۳-آل، کارواکرول اتیل اتر و ترپینن-۴-آل-استات) و ۲۰ درصد ترکیبات سزکوئی ترین (بی سیکلو جرماکرن، (E,E)-آلفا-فارنزن، جرماکرن B، اسپاتولنول و اپی سدرول) بودند. آلفا-فلاندرن، آلفا-پینن، بتا-پینن، ساینن و پارا-سیمن در هر دو روش بیشترین درصد را داشتند. نتیجه گیری کلی: در این پژوهش، برای اولین بار، یک روش آنالیز برای استخراج اسانس از میوه سیب در شرایط میکرواستخراج با

تک قطره در فضای فوقانی با استفاده از حلال‌های اتکتیک عمیق پیشنهاد شد. در تمامی تحقیقات پیشین، در روش‌های میکرواستخراج با تک قطره برای استخراج اسانس میوه سیب از حلال‌های مرسوم استفاده شده است. روش DESs-HS-SDME رویکردی سازگار با محیط زیست، ساده و کارآمد را برای استخراج ترکیبات اسانس میوه سیب ارائه می‌دهد. پیش‌بینی می‌شود که حلال‌های اتکتیک عمیق، به‌عنوان حلال‌های استخراج مناسب برای جداسازی ترکیبات فرار در نمونه‌های طبیعی با استفاده از روش میکرواستخراج با تک قطره در فضای فوقانی عمل نمایند.

واژه‌های کلیدی: مواد فرار، حلال سبز، روش نوین استخراج، عطر سیب.

مقدمه

طعم میوه‌ها و سبزیجات به دو عنصر کلیدی بستگی دارد. مزه، مشخصه‌ای که با تعادل هماهنگ بین شیرینی و اسیدیته و عطر که توسط غلظت ترکیبات آلی فرار تعیین می‌شود. اگرچه مشخصات کلی طعم، ادغام این دو عامل است اما عطر اغلب به عنوان محرک اصلی در نظر گرفته می‌شود (Kader, 2008). با توجه به اینکه پروفایل طعم شامل ارزیابی تعداد زیادی ترکیبات آلی فرار می‌شود، ارزیابی کامل آنها برای اطمینان از انتخاب میوه‌های با کیفیت بالا ضروریست. Spino-Diaz و همکاران (۲۰۱۶) بیش از ۳۰۰ ترکیب آلی فرار مرتبط با طعم و عطر سیب را شناسایی کردند. این مجموعه گسترده از ترکیبات بر پیچیدگی‌هایی تأکید می‌کند که مصرف‌کنندگان و اعضای گروه حسی آموزش دیده هنگام توصیف طعم سیب با آن مواجه می‌شوند. بررسی ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی و پروفایل‌های عطر سیب در زمینه فراوری پس از برداشت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا شرایط تجربه شده در طول بسته‌بندی، حمل و نقل و انبار می‌تواند به طور قابل توجهی بر ماندگاری و طراوت محصول تأثیر بگذارد (Cirillo et al., 2024).

روش‌های مرسوم برای استخراج ترین‌ها در محصولات طبیعی تقطیر با آب، تقطیر با بخار، تقطیر با آب و بخار و استخراج با حلال است. معمولاً این فرایندها شامل دوره استخراج طولانی و پیچیده، عملکرد کم و حجم زیاد حلال‌های آلی خطرناک هستند. در جستجوی آماده‌سازی «سبزتر» نمونه، تکنیک‌های میکرواستخراج ظهور کرده‌اند. این روش‌ها حساسیت بالا داشته و به حجم کم حلال‌های آلی (حتی بدون حلال) نیاز دارند. علاوه بر این، استفاده از آنها

ساده، کم‌هزینه و قابل اتوماسیون است (Triaux et al., 2020). تکنیک‌های مختلف میکرواستخراج برای تعیین مواد شیمیایی فرار در گیاهان مانند میکرواستخراج با تک قطره (SDME) به کار رفته‌اند. برای افزایش حساسیت ارزیابی ترکیبات فرار، تکنیک‌های میکرواستخراج فضای فوقانی را می‌توان بدون هیچ گونه فرایند پیش تیمار نمونه اجرا نمود. در میکرواستخراج تک قطره در فضای فوقانی (HS-SDME)، یک قطره حلال چند میکرولیتری در نوک سوزن میکروسرنگ معلق می‌شود و در معرض فضای فوقانی نمونه قرار می‌گیرد. نمونه حرارت داده می‌شود، ترکیبات هدف تبخیر شده و روی قطره حلال جذب می‌شوند. پس از استخراج، قطره معلق به داخل میکروسرنگ جمع شده و اغلب توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز می‌گردد (Theis et al., 2001).

در روش SDME، یکی از عوامل اصلی که ممکن است بر کارایی استخراج تأثیر بگذارد، نوع حلال است (Plastiras et al., 2020). حلال‌های رایج مورد استفاده برای SDME مانند تولوئن، هگزان، ایزواکتان، دکان و n-اکتیل الکل برای محیط زیست سمی هستند و اغلب دارای فراریت قابل توجهی هستند که می‌تواند باعث تبخیر قطره شوند (Wardencki et al., 2007). اولین مایعات یونی (ILs) به دلیل فشار بخار ناچیز به عنوان جایگزینی برای حلال‌های آلی در HS-SDME پدید آمدند (Clark et al., 2018). با این حال، نگرانی در مورد استفاده از ILها برای استخراج ترکیبات زیست فعال به دلیل سمیت این حلال‌ها، اثرهای بالقوه آنها بر سلامت و محیط زیست، هزینه بالای مربوط به سنتز آنها و نیاز به تصفیه وجود داشت. برای غلبه بر محدودیت‌های ILها، حلال‌های اتکتیک عمیق (Deep eutectic solvents,)

مواد شیمیایی

معرف‌ها، حلال‌ها و ترین‌ها از شرکت مرک (Merck, Germany) و فلوکا (Fluka, Switzerland) تهیه شدند. ChCl و 4-Chlorophenol از شرکت مرک خریداری شد. همه مواد با درجه آنالیتیکال مورد استفاده قرار گرفتند.

دستگاه‌های مورد استفاده

دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل 7890A ساخت کمپانی Agilent (آمریکا) مجهز به آشکارساز طیف‌سنجی جرمی (Mass Spectroscopy) مدل 5975C و دریچه تزریق Split/Splitless برای اندازه‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. سرعت جریان گاز هلیوم ۹۹/۹۹۹ درصد) به عنوان گاز حامل ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد. جداسازی با ستون کاپیلاری مدل MS HP-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر با پوشش فاز ساکن سیلیکا به ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. شرایط کارکرد دستگاه GC بدین شرح بود: دمای اولیه ستون به مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد. در مرحله بعد، با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد به دمای ۲۰۰ درجه و در مرحله آخر با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد به دمای ۲۸۰ درجه رسیده و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد. دمای دریچه تزریق ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

تهیه حلال اتکتیک

در بررسی مقدماتی، حلال‌های اتکتیک شامل گیرنده پیوند هیدروژنی (HBA) (ChCl) و دهنده پیوند هیدروژنی (HBD) (فنل، ۴-کلروفنل و اتیلن گلیکول) در نسبت‌های مولی مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. در همه موارد نسبت ۱:۲ مولی ترکیبات HBA و HBD مایع‌های یکنواختی (DESs) به دست آمد. بنابراین برای تهیه حلال اتکتیک عمیق، ۰/۱۳ گرم ChCl به عنوان گیرنده پیوند هیدروژنی و مقدار مناسبی از دهنده‌های پیوند هیدروژنی مختلف مانند فنل، ۴-کلروفنل و اتیلن گلیکول به یک لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری در بدار اضافه گردید. به مدت ۸ دقیقه در حمام آبی در دمای

(DESs) پدید آمده‌اند (Zainal-Abidin et al., 2017). حلال‌های اتکتیک عمیق، مواد جدیدی هستند که در سال‌های اخیر توسعه یافته‌اند. آنها دارای ویژگی‌هایی مانند سمیت کم، پایداری حرارتی خوب، روش‌های آماده‌سازی ساده و هزینه کم هستند. DESها این ظرفیت را دارند که جایگزین حلال‌های استخراج آلی سنتی شوند. DESها از یک دهنده پیوند هیدروژنی (Hydrogen bond donor, HBD) و گیرنده پیوند هیدروژنی (Hydrogen bond acceptor, HBA) تشکیل می‌شوند. تغییر نوع HBA و HBD یا نسبت آنها منجر به تغییرات در ساختار و خواص DESهای حاصل می‌شود. این دو ترکیب در یک نسبت مولی دقیق به نام نقطه اتکتیک (Eutectic point) مخلوط می‌شوند که در آن به سادگی با حرارت دادن، یک مایع حلال جدید در درجه حرارت اتاق تشکیل می‌گردد (Triaux et al., 2020). به‌طور مشخص، در روش SDME حلال با ویسکوزیته بالا باعث تعلیق قطرات بزرگ‌تر و پایداری در نوک سوزن می‌شود. بنابراین، DESها را می‌توان به دلیل ویژگی‌های مطلوب آنها، مانند ویسکوزیته بالا در دمای اتاق، پایداری حرارتی بالا و فراریت کم مورد استفاده قرار داد (Plastiras et al., 2020). براساس بحث بالا، هدف این پژوهش توسعه یک روش استخراج قوی و کارآمد برای شناسایی مواد فرار میوه سیب براساس حلال‌های سبز جدید (حلال‌های اتکتیک عمیق) با استفاده از روش میکرواستخراج با تک‌قطره در فضای فوقانی و مقایسه آن با روش مرسوم تقطیر با آب است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

میوه سیب رقم رد دلشیز (*Malus domestica* Borkh.) در مرحله رسیدن فیزیولوژیکی در پاییز "Red delicious" در مرحله رسیدن فیزیولوژیکی در پاییز سال ۱۴۰۲ از باغی واقع در روستای کرده‌ده شهر مراغه (استان آذربایجان شرقی) جمع‌آوری شده و تا زمان انجام آزمایش، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

یک میکروسرنج ۱۰ میکرولیتری (Hamilton, USA) حاوی ۲ میکرولیتر DES به عنوان حلال استخراج در فضای فوقانی نمونه قرار گرفت (شکل ۱). با فشار دادن پیستون سرنج یک میکروقطره از حلال استخراج در نوک سرنج معلق شده و نمونه گیاه توسط مایکروویو گرم شد. بعد از ۵۰ دقیقه استخراج، میکروقطره به داخل سرنج برگردانده شد. در نهایت میکروقطره به دستگاه GC تزریق گردید. با استفاده از تکنیک DESs-HS-SDME ترکیبات فرار میوه سیب با گرم شدن به فضای فوقانی نمونه منتقل شده و در میکروقطره معلق حلال DES استخراج گردید. تکنیک (One factor) OFAT برای بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در کارایی استخراج در این فرایند استفاده شد. در این تکنیک با ثابت نگه داشتن تمامی متغیرهای دیگر، متغیر مورد نظر در محدوده مشخصی تغییر داده می‌شود و بعد با تأثیر آن بر روی پاسخ فرایند، مقدار بهینه متغیر انتخاب می‌گردد. در طی بهینه‌سازی مساحت نسبی ۴ پیک اصلی در کروماتوگرام GC-MS مورد بررسی قرار گرفت. تکنیک DESs-HS-SDME روش مبتنی بر تعادل است و یک ارتباط مستقیم بین زمان استخراج و مقدار ماده استخراج شده وجود دارد.

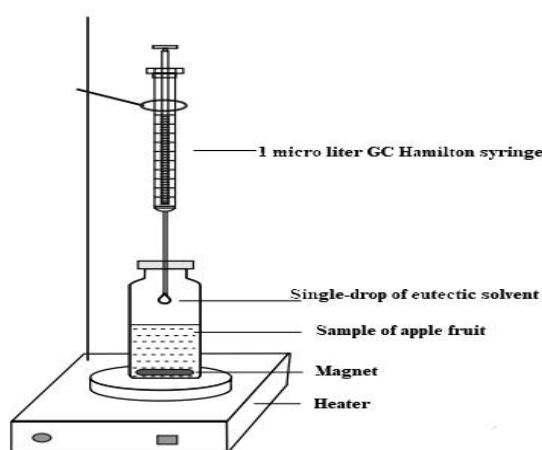
۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس تا زمان به دست آمدن مایع یکنواخت (۱۲ دقیقه) ورتکس شد.

اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب

برای به دست آوردن مواد فرار، از روش مرسوم تقطیر با آب (Hydrodistillation, HD) استفاده گردید. بدین منظور، ۱۰۰ گرم از نمونه میوه سیب که در دمای آزمایشگاه خشک شده بود، در دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت جوشانده شد. اسانس به دست آمده از دستگاه جمع‌آوری شده و با سولفات سدیم بی‌آب، آب‌گیری گردید و در نهایت اسانس به دست آمده در شیشه تیره رنگ تا زمان آنالیز در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میکرواستخراج با تک‌قطره در فضای فوقانی با استفاده از حلال اتکتیک (DESs-HS-SDME)

فرایند کلی HS-SDME در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (Piryaei, 2022). در یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر آب، ۳ گرم از میوه خشک شده در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد گرم شد. بعد از مونتاژ یک کندانسور،



شکل ۱- نمایی از تکنیک میکرواستخراج با تک‌قطره در فضای فوقانی با استفاده از حلال اتکتیک

Figure 1. Schematic of deep eutectic solvents-based headspace single-drop microextraction (DESs-HS-SDME) technique

نتایج

اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب

با استفاده از روش استخراج مرسوم تقطیر با آب، ۲۵ ترکیب از اجزای اسانس میوه سیب شناسایی شد که از بین این ترکیبات ۷۶ درصد ترکیبات منوترین (آلفا-توجون، آلفا-پینن، کامفن، ساینن، بتا-پینن، میرسن، آلفا-فلاندرن، پارا-

سیمن، بتا-فلاندرن، Z-بتا-اوسیمین، E-بتا-اوسیمین، گاما-ترپینن، ترپینولن، آلفا-پینن اکساید، ترانس-ساینن هیدرات، سیس-ورینول، نتو-توجان-۳-آل، کارواکرول اتیل‌تر و ترپینن-۴-آل-استات) و ۲۰ درصد ترکیبات سزکوئی‌ترین (بی‌سیکلو جرماکرن، آلفا-E-E-فارنزن، جرماکرن B، اسپاتولنول و اپی-سدرول) بودند (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه ترکیبات اسانس میوه سیب (*Malus domestica* Borkh. "Red delicious") با دو روش تقطیر با آب و

میکرواستخراج با تک‌قطره در فضای فوقانی با استفاده از حلال اتکتیک

Table 1. Comparison of essential oil compounds of apple fruit (*Malus domestica* Borkh. "Red delicious") extracted by hydrodistillation and DESs HS-SDME method

No.	Compound	RI ^a	HD Area % ^b	DES-HS-SDME Area % ^c	R.S.D.% ^d
1	α -thujene	931	0.1	t	7.5
2	α -pinene	938	15.9	14.5	8.5
3	camphene	945	0.8	0.3	6.8
4	sabinene	973	12.6	14.3	9.1
5	β -pinene	975	15.1	14.1	8.6
6	myrcene	987	2.1	1.1	5.4
7	1-decene	990	1.1	1.6	6.7
8	α -phellandrene	1007	17.4	14.2	11.4
9	<i>p</i> -cymene	1022	8.3	7.1	8.7
10	β -phellanderne	1028	0.3	0.3	6.5
11	Z- β -ocimene	1042	4.3	4.8	7.6
12	E- β -ocimene	1054	0.1	0.1	7.5
13	γ -terpinene	1061	0.3	0.2	8.1
14	terpinolene	1070	0.1	-	-
15	α -pinene oxide	1091	3.2	3.2	8.5
16	<i>trans</i> -sabinene hydrate	1098	0.1	0.1	7.2
17	<i>cis</i> -verbenol	1143	0.1	0.1	6.8
18	neo-3-thujanol	1147	0.1	0.1	5.4
19	carvacrol-ethyl ether	1295	0.1	-	-
20	terpinen-4-ol-acetate	1331	0.1	0.1	6.1
21	bicyclogermacrene	1495	0.6	0.2	7.8
22	α -(E,E)-farnesene	1502	5.1	2.8	6.4
23	germacrene B	1556	3.6	2.3	7.3
24	spathulenol	1574	4.2	3.1	7.5
25	epi-cedrol	1605	0.1	-	-

a: Retention index, b: Peak area in hydrodistillation method, c: Peak area in DESs HS-SDME method, d: Relative standard deviation, and t: trace = less than 0.05.

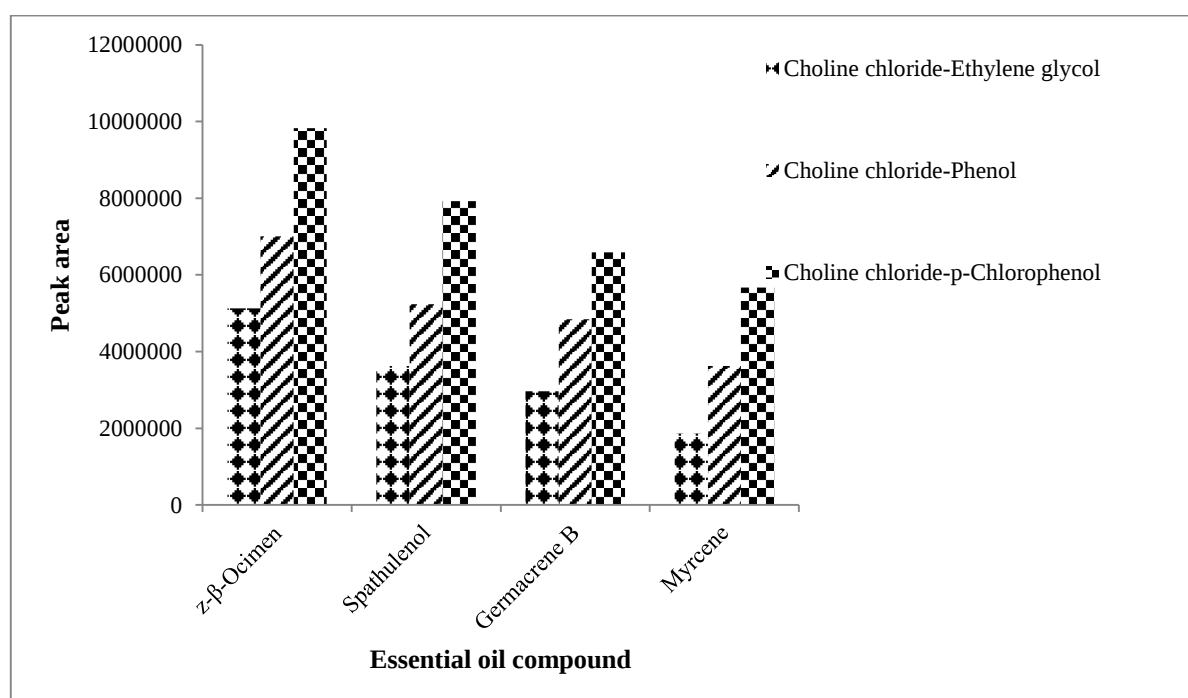
بهینه‌سازی HS-SDME

به منظور دستیابی به بازدهی استخراج بالای آنالیت‌ها با استفاده از روش DESs-HS-SDME برای استخراج اسانس میوه سیب، پارامترهای مختلف بر روی استخراج مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، برای توسعه تکنیک HS-SDME با استفاده از حلال‌های اتکتیک، پارامترهای مختلف برای بازده بهینه شامل نوع حلال اتکتیک، زمان و دمای استخراج، حجم قطره و وزن نمونه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نوع حلال اتکتیک

قبل از بهینه‌سازی پارامترهای استخراج، اثر نوع DES بر استخراج مواد فرار سیب توسط GC بررسی شد. انتخاب حلال مناسب در روش SDME ضرورت دارد که به نوع

ترکیبات استخراج شده بستگی دارد. بنابراین سه نوع DES شامل ChCl به عنوان HBA و ۴-کلروفنل، فنل و اتیلن گلیکول به عنوان HBDs تهیه شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. در شکل ۲ مقایسه ارتفاع پیک به دست آمده برای ۴ جزء اصلی اسانس میوه سیب (بتا-اوسیمین، اسپاتولنول، جرماکرن B و میرسن) آمده است. دما در این استخراج ۷۵ درجه سانتی‌گراد و مقدار حلال ۲ میلی‌لیتر انتخاب شد. بیشترین سیگنال و کمترین هم‌پوشانی با استفاده از حلال اتکتیک ChCl : 4-Chlorophenol به دست آمد. بنابراین این نوع حلال با بیشترین مساحت پیک، مؤثرترین حلال استخراج در بین حلال‌های اتکتیک بررسی شده در این مطالعه است که برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲- اثر نوع حلال اتکتیک بر روی کارایی استخراج اسانس میوه سیب (*Malus domestica* Borkh. "Red Delicious") با روش

DESs-HS-SDME

Figure 2. Eutectic solvent type effects on essential oil extraction efficiency of apple fruit (*Malus domestica* Borkh. "Red delicious") by DESs-HS-SDME method

زمان استخراج

HS-SDME یک روش مبتنی بر تعادل است و یک ارتباط مستقیم بین زمان و مقدار ماده استخراج شده وجود دارد. بنابراین زمان استخراج یک عامل کلیدی است که در کارایی استخراج تأثیر دارد. مقدار استخراج ۴ جزء اصلی اسانس میوه سیب در ۵ زمان ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه بررسی شد. دما در این استخراج ۷۵ درجه سانتی‌گراد و مقدار حلال ۲ میلی‌لیتر انتخاب شد. شکل ۳A مساحت پیک اجزای اصلی اسانس را در زمان‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رود، با افزایش زمان، کارایی استخراج افزایش می‌یابد. مطابق این شکل بعد از حدود ۵۰ دقیقه برای ترکیبات اسانس، تعادل به دست می‌آید. بنابراین زمان ۵۰ دقیقه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

دمای استخراج

دمای استخراج یک اثر دوگانه بر روی کارایی استخراج در روش HS-SDME دارد. با افزایش دما، از یکسو فشار بخار ماده استخراج شده بالا می‌رود، بنابراین غلظت آن در فضای فوقانی افزایش می‌یابد. از سوی دیگر با افزایش دما، ضریب جداسازی (Partition coefficient) ماده استخراج شده در فضای فوقانی و حلال استخراج کاهش می‌یابد. برای بررسی تأثیر دمای استخراج بر روی کارایی استخراج اجزای اسانس میوه سیب، ۵ دمای ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از تک‌قطره معلق به مدت ۵۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۳B، با افزایش دما تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد، میزان استخراج افزایش می‌یابد که به دلیل افزایش ثابت توزیع بین فضای فوقانی و فاز آبی است. برای همه ترکیبات بررسی شده با افزایش دما از ۸۰ درجه، کاهش ظرفیت جذب مشاهده گردید که به احتمال زیاد به دلیل کاهش ضریب جداسازی ماده استخراج شده در قطره حلال و فضای فوقانی است؛ زیرا جذب یک فرایند اگزوترمیک محسوب می‌شود. بنابراین دمای بهینه برای مراحل بعدی ۸۰ درجه سانتی‌گراد

به دست آمد.

حجم قطره

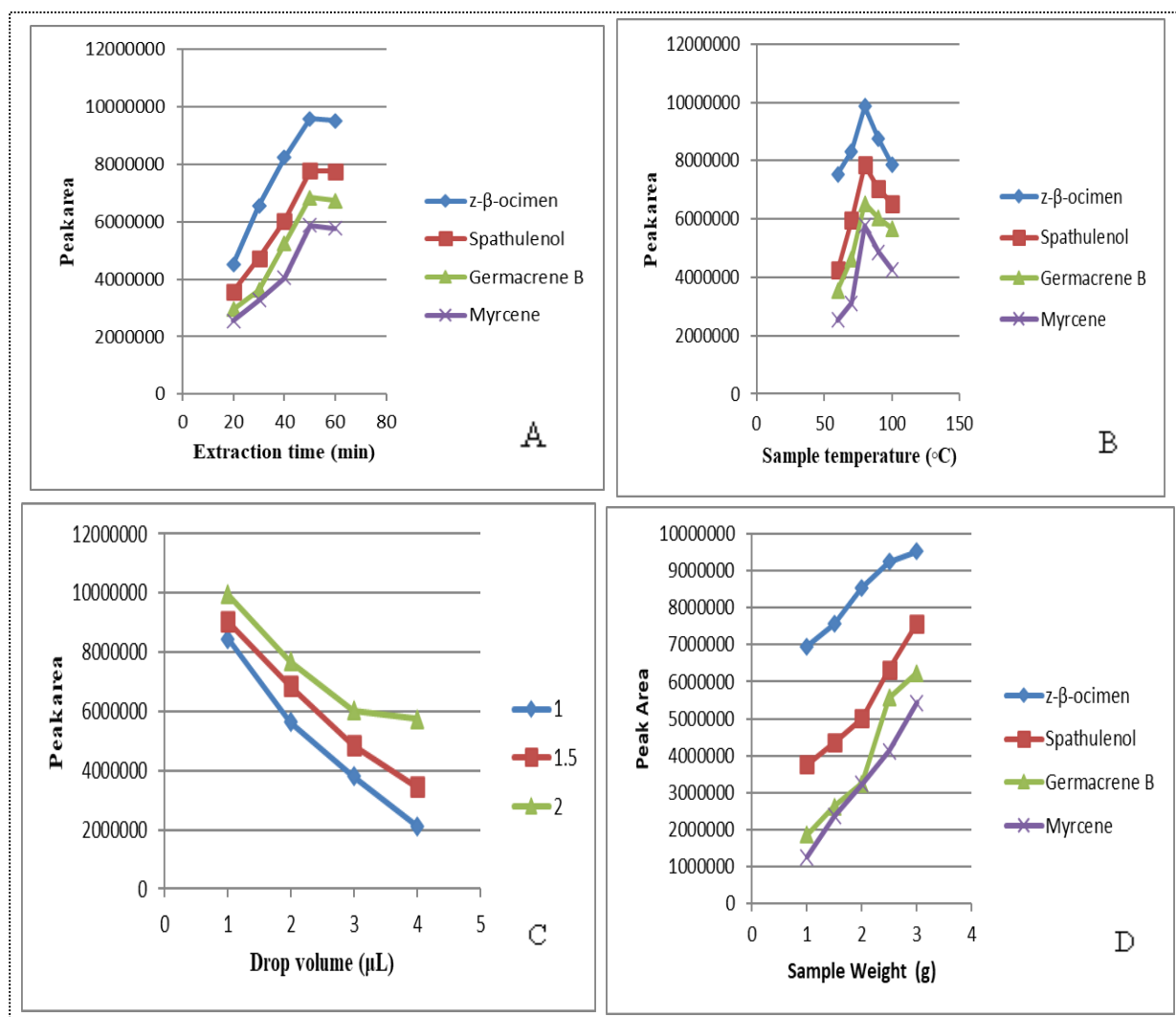
اثر حجم قطره (حجم DES) بر روی کارایی استخراج اجزای اسانس میوه سیب مورد ارزیابی قرار گرفت. بدیهی است استفاده از قطره بزرگ‌تر حلال منجر به افزایش ماده استخراج شده می‌گردد. اما کار با قطره بزرگ مشکل بوده و قابل اعتماد نیست. همچنین تزریق حجم بیشتر به دستگاه GC، پهنای باند بیشتری می‌دهد. بنابراین برای اطمینان از تشکیل یک قطره پایدار و قابل تکرار، حجم ۲ میکرولیتر حلال مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳C).

مقدار نمونه

مطابق شکل ۳D، در بررسی مقدار نمونه (۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ گرم) بر روی کارایی استخراج اجزای اسانس میوه سیب معلوم گردید که هر قدر مقدار نمونه افزایش می‌یابد، میزان ماده استخراج شده نیز بیشتر می‌گردد. بنابراین ۳ گرم نمونه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید.

مقایسه روش HD و DESs-HS-SDME

در جدول ۱ میزان اجزای اسانس به دست آمده میوه سیب با دو روش تقطیر با آب (HD) که یک تکنیک زمان‌بر با مصرف زیاد ماده گیاهی است با روش میکرواستخراج با تک‌قطره در فضای فوقانی با استفاده از حلال اتکتیک (DESs-HS-SDME) که در زمان کم و با استفاده از ماده گیاهی کم قابل انجام است، مقایسه شده است. در روش DESs-HS-SDME، ۲۲ ترکیب از اسانس میوه سیب جداسازی شده که با نتایج به دست آمده از روش HD (۲۵ ترکیب) مطابقت دارد. در مقایسه با روش HD، روش DESs-HS-SDME ساده بوده و در مدت زمان کم قابل انجام است و به مقدار کم نمونه نیاز دارد. برای ارزیابی دقت روش، میزان انحراف معیار نسبی (RSD) همه اجزای اسانس محاسبه گردید. مطابق جدول ۲ مقادیر RSD برای همه اجزای اسانس بین ۱۱/۴ - ۵/۴ درصد بود.



شکل ۳- اثر زمان استخراج (A)، دمای استخراج (B)، حجم قطره (C) و مقدار نمونه (D) بر روی کارایی استخراج اسانس میوه سیب

(*Malus domestica* Borkh. "Red delicious") با روش DESs-HS-SDME

Figure 3. Effects of extraction time (A), extraction temperature (B), drop volume (C), and sample weight (D) on essential oil extraction efficiency of apple fruit (*Malus domestica* Borkh. "Red delicious") by DESs-HS-SDME method

بحث

دارند که به آنها ترکیبات فعال عطر (Odor-active compounds) اطلاق می‌گردد (Yan et al., 2020). چندین محقق سعی کرده‌اند مواد فرار میوه سیب را شناسایی کرده و ترکیبات فعال عطر را توسط GC-MS و کروماتوگرافی اوفلاکتومتری (GC-O) غربال نمایند. در نتیجه بوتیل استات، هگزیل استات، اتیل بوتانوات، ۲-متیل بوتیل استات و سایر مواد فرار غالب در پروفایل کلی عطر ارقام سیب شناسایی

عطر سیب، به عنوان یک عامل مهم مؤثر در کیفیت سیب به مدت ۶۰ سال است که مورد مطالعه قرار گرفته است. تا به حال ۳۰۰ ترکیب فرار در میوه سیب شناسایی شده است که این ترکیبات عمدتاً به گروه استرها، الکل‌ها، آلدئیدها، کتون‌ها و ... تعلق دارند (Li et al., 2023). از بین این ترکیبات شناسایی شده، تعداد کمی در طعم سیب به طور مستقیم تأثیر

نماید (Aprea et al., 2017). علاوه بر این، فقدان (E,E)-آلفا-فارنزن باعث کاهش شدید کیفیت حسی عطر سیب رقم Honeycrisp می‌شود (Yan et al., 2020). ۵-هگزینول و (Z)-۳-هگزینول هر دو ترکیب، نت سبز (green notes) را دارند. (Z)-۳-هگزینول در چندین گونه سیب وجود دارد و به عنوان یک جزء مهم در عطر سیب تازه در نظر گرفته می‌شود (Mehinagic et al., 2006). با این حال، اهمیت ۵-هگزینول در عطر سیب گزارش نشده است. بنابراین، در حالی که یک سهم کوچک یا مثبت در خوش طعم بودن انتظار می‌رود، آنالیز Shimizu و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که افزایش غلظت این دو ترکیب معطر تأثیر منفی زیادی بر ارزش پیش‌بینی شده خوش طعم بودن حسی داشت. Li و همکاران (۲۰۲۳)، ۹۶ ترکیب فرار (۹۴ ترکیب در پوست و ۷۰ ترکیب در گوشت) را در میوه سیب رقم Qinguan شناسایی کردند. استرها ترکیبات غالب بودند و بعد از آن ترپن‌ها، آلدئیدها، ترکیبات آروماتیک، الکل‌ها، کتون‌ها و پنتیل‌فوران قرار داشتند. در نتایج تحقیق آنان نشان داده شده که استرها بیشترین سهم را در نت شبه‌سیب و میوه‌ای ('fruity' note) سیب‌های رسیده دارند، در حالی که آلدئیدها و الکل‌ها عمدتاً در عطر تازه و سبز سیب‌ها نقش دارند (Aprea et al., 2012; Buchhaupt et al., 2012; Wang et al., 2022). Niu و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که بوتیل‌استات، اتیل‌استات، اتیل‌بوتانوآت، اتیل‌پروپانوآت، اتیل ۲-متیل‌بوتانوآت و پروپیل ۲-متیل‌بوتانوآت، استرهای کلیدی عطر رقم Granny Smith هستند. Wu و همکاران (Wu et al., 2022) نیز اعلام نمودند که هگزانال و هگزینول در عطر سبز بسیاری از ارقام سیب مانند Golden Modi, Granny Smith, Starkrimson و Pinova, Delicious نقش دارند.

در این تحقیق اجزای ترکیبات فرار شناسایی شده در سیب رقم Red Delicious با دو روش تقطیر با آب (HD) و روش میکرواستخراج با تک‌قطره در فضای فوقانی با استفاده از حلال اتکنیک (DNSs-HS-SDME) استخراج و بعد با دستگاه GC-MS شناسایی گردید. در روش تقطیر با آب ۲۵ ترکیب جداسازی و شناسایی گردید که ۵ ترکیب اصلی

شدند (Chesnut و Power, 2006). (Mehinagic et al., 2006). (۱۹۲۲) برای اولین بار اجزای ترکیبات معطر سیب را گزارش نمودند که شامل عمدتاً پنتیل‌استرهای فرمیک‌اسید، استیک‌اسید و هگزانوئیک‌اسید، یک بخش قابل توجهی استیل‌آلدئیدها، ژرانیول و مقادیر کمی اتیل‌الکل و متیل‌الکل بودند. Flath و همکاران (۱۹۶۷) ترکیبات فرار سیب ارقام Delicious را بررسی کرده و ترکیبات اتیل ۲-متیل‌بوتیرات و هگزانال را در عطر سیب شناسایی کردند. Yajima و همکاران (۱۹۸۴) ۶۷ ترکیب هیدروکربن، الکل، آلدئید، کتون، استر و ترکیبات متفرقه دیگر را از آب میوه و پوست میوه سیب جداسازی و شناسایی کردند. Ferreira و همکاران (۲۰۰۹) نیز ترکیبات فرار ارقام مختلف سیب *Malus domestica* Borkh. را در مناطق جغرافیایی مختلف مطالعه نمودند و اعلام کردند که اتیل‌استرها، ترپن‌ها و الکل‌های آلی، اجزای اصلی ترکیبات فرار سیب هستند. Shimizu و همکاران (۲۰۲۴) ۱۲۱ ترکیب معطر از ترکیبات معطر ۱۷۴ ژنوتیپ میوه سیب را جداسازی نمودند که از بین آنها ترکیبات ۵-هگزینول، اتیل ۲-متیل‌بوتیرات، ۲-متیل‌بوتیل‌استات، (E,E)-آلفا-فارنزن و (Z)-۳-هگزینول به عنوان ترکیبات کلیدی عطر سیب معرفی شدند. ارقامی که به‌طور گسترده پرورش می‌یابند، مانند «Golden Delicious» و «Fuji» که از نظر پروفایل مواد فرار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و نتایج ترکیبات رایج مانند هگزینول‌استات را نشان می‌دهد. مواد فرار شناسایی شده از سیب کامل و گوشت سیب متفاوت است. با این حال، یک همبستگی قوی بین مواد فرار مربوط به میوه‌های دست‌نخورده و آب‌میوه آنها پیدا شده است (Chitarrini et al., 2020; Lee et al., 2017).

اتیل‌استرها و استات‌ها قبلاً به عنوان اجزای مهم عطر سیب گزارش شده است (Tanaka et al., 2020; Young et al., 1996). Shimizu و همکاران (۲۰۲۴) پیشنهاد دادند که این دو ترکیب معطر از عوامل کیفی مهم سیب بوده و ترکیبات معطر کلیدی هستند که مقدار آنها در خوش طعم بودن میوه مؤثر است. (E,E)-آلفا-فارنزن در پوست و گوشت سیب بسیار وجود دارد و باعث می‌شود که عطری شبیه کیوی تولید

بتا-پنین، ساینین، پارا-سیمن و (E,E)-آلفا-فارنزن به ترتیب دارای بیشترین درصد بودند. ترکیب اخیر در بسیاری از ارقام سیب گزارش شده است. (E,E)-آلفا-فارنزن یک ترکیب سزکوئی ترین هیدروکربنه است که در سیب و برخی دیگر از میوه‌ها وجود دارد و بوی مشخص سیب سبز را ایجاد می‌کند (Green et al., 2007).

در این تحقیق، تکنیک DESs-HS-SDME با استفاده از دستگاه GC-MS به عنوان یک روش کارآمد میکرواستخراج برای استخراج اسانس میوه سیب مورد استفاده قرار گرفت. یک روش ساده برای بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در کارایی استخراج استفاده شد. حلال‌های اتکتیک به عنوان نوع جدیدی از حلال‌ها استفاده شد که غیرقابل اشتعال، غیرفرار، دارای فشار بخار پایین، پایداری حرارتی مناسب، تجزیه‌پذیر در محیط‌زیست، سمیت کم و امکان استفاده دوباره هستند. همچنین فرایند پیشنهاد شده سریع و ساده است. با تکنیک DESs-HS-SDME، ۲۲ ترکیب از اسانس میوه سیب جداسازی گردید که با نتایج به دست آمده با روش تقطیر با آب (HD) تأیید شد. تکنیک استفاده شده در مقایسه با تقطیر با آب نیاز به ماده گیاهی کم داشته، ساده بوده و به زمان کمتری نیاز دارد.

عبارت بودند از: آلفا-فلاندرن (۱۷/۴٪)، آلفا-پنین (۱۵/۹٪)، بتا-پنین (۱۵/۱٪)، ساینین (۱۲/۶٪) و پارا-سیمن (۸/۳٪). در روش DNSs-HS-SDME نیز ۲۳ ترکیب جداسازی و شناسایی شد که نوع ترکیبات با روش تقطیر با آب کاملاً مطابقت داشت. درصد این ترکیبات نیز در این روش عبارت از آلفا-پنین (۱۴/۵٪)، ساینین (۱۴/۳٪)، آلفا-فلاندرن (۱۴/۲٪)، بتا-پنین (۱۴/۱٪) و پارا-سیمن (۷/۰۷٪) بودند. آنالیز ما شامل اطلاعاتی بود که با بسیاری از نتایج قبلی که با ارقام مختلف سیب انجام شده‌اند، مغایرت داشت. بنابراین برای تأیید ترکیبات شناسایی شده میوه سیب قرمز انجام آزمایش‌های بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. نتایج تحقیق Esmaeili و همکاران (۲۰۱۳) بیشترین مطابقت را با نتیجه ما داشت که در آن منوترین‌های هیدروکربنه جداسازی شده از ترکیبات فرار غالب پوست سیب بودند و در بین آنها، آلفا-فلاندرن، آلفا-پنین، بتا-پنین و منتا-۱ (۷) و ۸-دی‌ان ترکیبات اصلی معرفی گردیدند. همچنین سزکوئی‌ترین‌های هیدروکربنه در مرتبه بعدی قرار داشتند و پایین‌ترین درصد مربوط به منوترین‌های اکسیژن‌دار بود. در حالی که هیچ سزکوئی‌ترین اکسیژن‌دار شناسایی نگردید. در نتایج ما هم ۷۶ درصد ترکیبات منوترین و ۲۰ درصد ترکیبات سزکوئی‌ترین شناسایی شدند که از بین آنها آلفا-فلاندرن، آلفا-پنین،

References

- Aprea, E., Charles, M., Endrizzi, I., Laura Corollaro, M., Betta, E., Biasioli, F. and Gasperi, F., 2017. Sweet taste in apple: The role of sorbitol, individual sugars, organic acids and volatile compounds. *Scientific Reports*, 7(1), 44950. <https://doi.org/10.1038/srep44950>
- Aprea, E., Corollaro, M. L., Betta, E., Endrizzi, I., Demattè, M. L., Biasioli, F. and Gasperi, F., 2012. Sensory and instrumental profiling of 18 apple cultivars to investigate the relation between perceived quality and odour and flavour. *Food Research International*, 49(2), 677-686. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.023>
- Buchhaupt, M., Guder, J.C., Etschmann, M.M.W. and Schrader, J., 2012. Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipxygenase and hydroperoxide lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 159-168. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3482-1>
- Chitarrini, G., Dordevic, N., Guerra, W., Robatscher, P. and Lozano, L., 2020. Aroma investigation of new and standard apple varieties grown at two altitudes using gas chromatography-mass spectrometry combined with sensory analysis. *Molecules*, 25(13), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules25133007>
- Cirillo, A., Spadafora, N.D., James-Knight, L., Ludlow, R.A., Müller, C.T., De Luca, L., Romano, R., Rogers, H.J. and Di Vaio, C., 2024. Comparison of Volatile Organic Compounds, Quality, and Nutritional Parameters from Local Italian and International Apple Cultivars. *Horticulturae*, 10(8), 863. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10080863>
- Clark, K.D., Emaus, M.N., Varona, M., Bowers, A.N. and Anderson, J.L., 2018. Ionic liquids: solvents and

- sorbents in sample preparation. *Journal of Separation Science*, 41(1), 209-235. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700864>
- Esmaili, A., Abednazari, S., Abdollahzade, Y., Abdollahzadeh, N., Mahjoubian, R. and Tabatabaei Anaraki, M., 2013. Peel Volatile Compounds of Apple (*Malus domestica*) and Grapefruit (*Citrus Paradisi*). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15, 794-799. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644122>
 - Espino-Díaz, M., Sepúlveda, D.R., González-Aguilar, G. and Olivas, G.I., 2016. Biochemistry of apple aroma: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), 375-397. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.04.16.4248>
 - Ferreira, L., Perestrelo, R., Caldeira, M. and Câmara, J.S., 2009. Characterization of volatile substances in apples from rosaceae family by headspace solid-phase microextraction followed by GC-qMS. *Journal of Separation Science*, 32(11), 1875-1888. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900024>
 - Flath, R.A., Black, D.R., Guadagni, D.G., McFadden, W.H. and Schultz, T.H., 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15(1), 29-35. <https://doi.org/10.1021/jf60149a032>
 - Green, S., Friel, E.N., Matich, A., Beuning, L.L., Cooney, J.M., Rowan, D.D. and MacRae, E., 2007. Unusual features of a recombinant apple α -farnesene synthase. *Phytochemistry*, 68(2), 176-188. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.017>
 - Kader, A.A., 2008. Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 1863-1868. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3293>
 - Lee, Y.Y., Jeong, M.C. and Jang, H.W., 2017. Determination of volatile compounds by headspace-solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry: Quality evaluation of Fuji apple. *Analytical Science and Technology*, 30(2), 68-74. <https://doi.org/10.5806/AST.2017.30.2.68>
 - Li, R., Shi, J., Li, C., Ren, X., Tao, Y., Ma, F., Liu, Z. and Liu, C., 2023. Characterization of the key odorant compounds in 'Qinguan' apples (*Malus domestica*). *LWT-Food Science and Technology*, 184, 115052. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115052>
 - Mehinagic, E., Royer, G., Symoneaux, R., Jourjon, F. and Prost, C., 2006. Characterization of odor-active volatiles in apples: influence of cultivars and maturity stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2678-2687. <https://doi.org/10.1021/jf052288n>
 - Niu, Y., Wang, R., Xiao, Z., Zhu, J., Sun, X. and Wang, P., 2019. Characterization of ester odorants of apple juice by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, odour threshold, aroma intensity and electronic nose. *Food Research International*, 120, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.064>
 - Piryaee, M., 2022. Deep Eutectic Solvents as an Efficient Solvent System Determination the Volatile Compounds with Microextraction. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 41(1), 135-142. <https://doi.org/10.30492/ijcce.2020.123956.4063>
 - Plastiras, O.E., Andreasidou, E. and Samanidou, V., 2020. Microextraction Techniques with Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 25, 6026. <https://doi.org/10.3390/molecules25246026>
 - Power, F.B. and Chesnut, V.K., 1922. The odorous constituents of apples. II. Evidence of the presence of geraniol. *Journal of the American Chemical Society*, 44(12), 2938-2942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja01433a033>
 - Shimizu, T., Hattori, Y., Ogami, S., Imayoshi, Y., Moriya, S., Okada, K., Sawamura, Y. and Abe, K., 2024. Identification of aroma compounds responsible for apple flavor via palatability score prediction in tree-based regression models. *LWT-Food Science and Technology*, 192, 115737. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115737>
 - Tanaka, F., Hayakawa, F. and Tatsuki, M., 2020. Flavor and texture characteristics of 'Fuji' and related apple (*Malus domestica* L.) cultivars, focusing on the rich watercore. *Molecules*, 25(5), 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules25051114>
 - Theis, A.L., Waldack, A.J., Hansen, S.M. and Jeannot, M.A., 2001. Headspace solvent microextraction: a very rapid method for identification of volatile components of Iranian *Pimpinella anisum* seed. *Analytical Chemistry*, 73(23), 5651-5654. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.006>
 - Triaux, Z., Petitjean, H., Marchioni, E., Boltoeva, M. and Marcic, C., 2020. Deep eutectic solvent-based headspace single-drop microextraction for the quantification of terpenes in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 933-948. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02317-9>
 - Wang, Q., Gao, F., Chen, X., Wu, W., Wang, L., Shi, J., Huang, Y., Shen, Y., Wu, G. and Guo, J., 2022. Characterization of key aroma compounds and regulation mechanism of aroma formation in local Binzi (*Malus pumila* × *Malus asiatica*) fruit. *BMC Plant Biology*, 22(1), 532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12870-022->

[03896-z](#)

- Wardencki, W., Curyło, J. and Namieśnik, J., 2007. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 275-288. <https://doi.org/10.1080/10408347.2013.833850>
- Wu, X., Bi, J. and Fauconnier, M.L., 2022. Characteristic volatiles and cultivar classification in 35 apple varieties: A case study of two harvest years. *Foods*, 11(5), 690. <https://doi.org/10.3390/foods11050690>
- Yajima, I., Yanai, T., Nakamura, M., Sakakibara, H. and Hayashi, K., 1984. Volatile flavor components of Kogyoku apples. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(4), 849-855. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866249>
- Yan, D., Shi, J., Ren, X., Tao, Y., Ma, F., Li, R., Liu, X. and Liu, C., 2020. Insights into the aroma profiles and characteristic aroma of 'Honeycrisp' apple (*Malus× domestica*). *Food Chemistry*, 327, 127074. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127074>
- Young, H., Gilbert, J. M., Murray, S. H., and Ball, R. D., 1996. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(3), 329-336. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199607\)71:3<329::AID-JSFA588>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199607)71:3<329::AID-JSFA588>3.0.CO;2-8)
- Zainal-Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A. and Jayakumar, N. S., 2017. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 979, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>