



## استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک فناوری امواج فراصوت

رکسانه روحانی<sup>۱</sup>، سودابه عین افشار<sup>۲\*</sup>، ریحانه احمدزاده<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۷

### چکیده

کاسبرگ، گلبرگ و پرچم از محصولات فرعی در فرآیند تولید زعفران هستند که در ایران هیچگونه استفاده‌ای از آن‌ها صورت نمی‌گیرد. این محصولات جانبی حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای آنتوسیانین و آنتی‌اکسیدان می‌باشند. در این پژوهش استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی از پرچم گل زعفران با استفاده از مخلوط حلال اتانول و اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال (۸۵/۱۵) و امواج فراصوت انجام شد. به منظور بررسی اثر فرآیند فراصوت در بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتوسیانینی، سه زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و شدت صوت ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد بکار رفت. نتایج نشان داد زمان ۱۵ دقیقه و شدت صوت ۱۰۰ درصد، بیشترین بازده استخراج عصاره (۵۴/۴۸ درصد) و زمان ۱۰ دقیقه و شدت صوت ۱۰۰ درصد بیشترین میزان استخراج ترکیبات آنتوسیانینی (۴۸/۸۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، پلی‌فنول کل (۳۶/۵۴ mg/ml)، قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH (۳۳۵/۷ mg/ml) و میزان قدرت احیاکنندگی آهن (۳۳۱/۱) میکرومول بر لیتر آهن III را داشتند لذا شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از پرچم گل زعفران با استفاده از امواج فراصوت زمان ۱۰ دقیقه و شدت صوت ۱۰۰ درصد بود.

**واژه‌های کلیدی:** آنتوسیانین، اسپکتروسکوپی، پرچم زعفران، قدرت آنتی‌اکسیدانی، فراصوت.

### مقدمه

پرچم حاوی کرده است که با غذاهای معمول مورد استفاده انسان قابل مقایسه نمی‌باشد، زیرا منبعی غنی از پروتئین است و دارای تمام ترکیبات ضروری مانند: کربوهیدرات، چربی‌ها، مواد معدنی و ویتامین‌های مورد نیاز برای یک رژیم غذایی کامل می‌باشد و در مقایسه با گوشت بدون چربی ۶-۵ برابر اسید آمینه بیشتر دارد. مهمترین خاصیت درمانی کرده پیشگیری و درمان سرطان بویژه سرطان پروستات می‌باشد که در این زمینه تحقیقات فراوانی در زمینه پزشکی و دارویی انجام شده است. تولیدات صنعتی حاصل از کرده در سایر کشورها بسیار متعدد و متداول است که اجرای آن به دلیل خواص درمانی و تغذیه‌ای بالای دانه کرده و توجیه اقتصادی آن است (ایبانوزی، ۱۹۹۳).

چنانچه بتوان از ضایعات گل زعفران محصولات جانبی با ارزش افزوده از جمله انواع رنگهای خوراکی مانند آنتوسیانین (همتی، ۱۳۸۹)، تهیه نمود علاوه بر جلوگیری از آلودگی محیط زیست، دارای ارزش افزوده بالایی نیز خواهد بود.

یکی از خصوصیات کیفی مواد غذایی رنگ است. چنانچه محصول غذایی از رنگ مناسبی برخوردار نباشد با کاهش شدید عرضه

درصد وزنی اجزای تشکیل دهنده گل تازه زعفران شامل ۸۶/۴۲ درصد گلبرگ و کاسبرگ، ۵/۹۳۵ درصد پرچم و ۷/۶۴۵ درصد کلاله و خامه است (همتی، ۱۳۸۹). در حال حاضر ایران با بیش از ۶۵ درصد تولید جهانی به عنوان بزرگترین تولیدکننده و صادر کننده زعفران در جهان به شمار می‌آید. سطح زیر کشت و میزان تولید گل زعفران در خراسان در سالهای ۱۳۹۰-۱۳۸۹، ۵۸۷۴۷ هکتار با تولید ۲۰۹۹۶۰ تن بوده است که از این میزان تولید در حدود ۲۱۰ تن زعفران حاصل می‌شود (بی‌نام، آمارنامه کشاورزی، سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸). تقریباً همین اندازه نیز پرچم می‌توان از گل‌های زعفران استحصال نمود.

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، ایران.

۲- استادیار بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی

(\* - نویسنده مسئول: Email: Soodabeheyn@yahoo.com)

مهدوی خزاعی و همکاران (۱۳۹۳)، در پژوهشی به بررسی بهینه‌سازی استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران به روش سطح پاسخ پرداختند. در این پژوهش شرایط بهینه استخراج آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران بوسیله حلال اتانول اسیدی (اتانول ۹۶٪، اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال) تعیین شد.

Burin و همکاران (۲۰۱۳) استخراج آنتوسیانین‌های انگور را بهینه نمودند و آنها را ریزپوشانی نموده در نوشابه‌های غیر الکلی اضافه کردند آنها فرآیند استخراج آنتوسیانینها را با استفاده از اتانول اسیدی (با اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال) به نسبت ۸۵ به ۱۵ بهینه نمودند.

استخراج به کمک امواج فراصوت در مقایسه با سایر روش‌های استخراج مانند استخراج با مایکروویو، ارزانتر بوده و کاربرد آن ساده‌تر است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون مربوط می‌شود که طی آن حبابهای بسیار ریزی در مایع تشکیل شده، به سرعت تا اندازه بحرانی رشد می‌کنند و منفجر می‌گردند. از اینرو استفاده از این امواج در استخراج ترکیبات مختلف از بافت‌های گیاهی، راندمان عمل و سرعت فرایند استخراج را افزایش داده و مصرف حلال را کاهش می‌دهد (بصری، ۱۳۹۰). امواج فراصوت دارای اثرات مکانیکی بوده که باعث افزایش نفوذپذیری حلال در بافت‌های سلولی شده و در نهایت منجر به انتقال جرم بهتر و سریع تر می‌شوند. سلول‌های زنده تحت تاثیر امواج فراصوت، تخریب می‌شوند و مواد درون خود را بهتر و آسان تر رها می‌کنند. از جمله مزایای این روش می‌توان به افزایش کارایی فرآیند و افزایش سرعت عمل اشاره نمود (Fernandes et al., 2008). فرآیند استخراج با حلال شامل دو مرحله غوطه وری بافت گیاهی در حلال به منظور جذب و تورم بافت و سپس انتقال مواد از بافت به داخل حلال از طریق فرآیندهای انتشار و اسمز است. امواج فراصوت، هر دو مرحله فرآیند استخراج یعنی تورم بافت و نیز خروج ترکیبات از آن را از طریق ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلول‌ها و بهبود انتشار و انتقال جرم تسهیل می‌کنند (Vinatoru et al., 2001). از این رو استفاده از فراصوت در فرآیند استخراج، راندمان عمل و سرعت فرآیند استخراج را افزایش و مصرف حلال را کاهش می‌دهد. در مطالعه ای که در خصوص اثر استفاده از امواج فراصوت بر استخراج روغن از دانه‌های آسیاب شده زیتون انجام پذیرفت، مشخص شد دیواره سلول‌ها و بافت‌های گیاهی در حضور این امواج تخریب شده، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (پلی فنل‌ها و توکوفرول‌ها) و رنگدانه‌های (کلروفیل و کاروتنوئید) بیشتری به داخل روغن راه می‌یابد. که باعث افزایش ارزش تغذیه‌ای می‌گردد (جیمز و بلتران، ۲۰۰۷). در بیشتر موارد به دلیل اثر مکانیکی امواج فراصوت، غالباً از آنها به عنوان عامل کمکی در فرآیند استخراج استفاده می‌شود (Mason and paniwnyk, 1996). در مقایسه با سایر روش‌های استخراج از جمله استخراج بر پایه ماکروویو، استفاده از امواج فراصوت ارزان تر بوده و کاربرد آنها ساده تر است (Chan et

مواجه خواهد شد) (خانی پور و همکاران، ۱۳۸۷). با افزایش مضرات و خطرات رنگهای مصنوعی و کاربرد گسترده آنها در مواد غذایی، استخراج و خالص سازی عصاره‌های رنگی از منابع طبیعی ارزان قیمت مورد توجه خاصی قرار گرفته است (لطفی و همکاران، ۱۳۸۷). آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان بالقوه در محیط *invitro* است. مطالعات نشان داده که آنتوسیانین‌های طبیعی موجود در ممانعت از بیماری‌های عروقی، کاهش سطح تری‌گلیسیرید و اسیدهای چرب آزاد موثر هستند. آنتوسیانینها بیشتر از فلاونوئیدها، در مهار رشد سلولهای توموری موثراند (خنافری و همکاران، ۱۳۸۸).

آنتی‌اکسیدانها نقش مهمی در حفاظت بافتها در مقابل اثرات اکسیدکنندگی رادیکالهای آزاد اکسیژن و سایرگونه‌های فعال ایفا می‌کنند، به طوریکه از بروز بیماری‌های متعددی از جمله بیماری‌های التهابی، سرطان، دیابت، سکنه قلبی، آلزایمر و پارکینسون جلوگیری می‌نمایند (سپهریفر و همکاران، ۱۳۸۸). همچنین مطالعات دراز مدت روی حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است برخی انواع آنتی‌اکسیدانهای سنتزی باعث ایجاد تومور در قسمت‌های مختلف بدن، جهش‌های ژنتیکی و آثار از این دست می‌شوند. از این رو، دامنه‌ی کاربرد آنها روز بروز محدودتر می‌شود و لزوم یافتن منابع طبیعی غنی از این مواد افزودنی بیش از پیش حس می‌گردد. گیاهان حاوی انواع آنتی‌اکسیدانهای همچون ویتامینها (C, E, A)، پلی فنلها، آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها هستند که قادر به واکنش با انواع رادیکالهای آزاد و تاخیر در وقوع بیماریها می‌باشند (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۸۴). لذا عصاره ضایعات گل زعفران منبعی ارزان برای تولید آنتی‌اکسیدان طبیعی خواهد بود.

آنتوسیانین‌ها با دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا (در حدود ۸۵٪ آنتی‌اکسیدان‌های معروف مثل توکوفرول) می‌توانند جایگزین خوبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنایع غذایی باشند (فاطمی، ۱۳۷۸). در استخراج آنتوسیانینها حلال‌های آبی و الکلی مانند: اتانول، متانول و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد. فرآیند استخراج آنتوسیانینها عموماً در محیط‌های اسیدی صورت می‌گیرد (Gould et al., 2008). در پژوهش صورت گرفته روی استخراج آنتوسیانین موجود در عصاره‌ی هویج سیاه مشاهده شد که افزایش pH از ۳/۴ تا ۶ موجب تخریب رنگدانه شده و بطور کلی در pH‌های بالاتر از ۵ کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان آنتوسیانین منومری مشاهده شد (Kirca et al., 2007). اسید کلریدریک همچنین می‌تواند موجب تغییر شکل آنتوسیانین‌ها از جمله هیدرولیز آن در شرایط اسیدی در تبخیر کننده دوار (با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) گردد (Van Sumere et al., 1985) و یا از آسیب‌شدن آنها با اسیدهای آلفاتیک در دمای اتاق جلوگیری کند (Harbourn et al., 1986). آنتوسیانین‌های آسیله شده دارای پایداری بالاتری نسبت به آنالوگ‌های غیر آسیله‌ی خود می‌باشند (Yoshida et al., 1997; Bridle & Timberlake, 1997).

اولتراسونیک ساخت شرکت هلشر آلمان مدل یوپی ۴۰۰ اس<sup>۱</sup> با قدرت ۴۰۰ وات و پروب H<sub>v</sub> از جنس تیتانیوم با قطر ۷ میلی‌متر، طول ۱۰۰ میلی‌متر و ۱ cycle انجام شد (فرهوش، ۲۰۰۶).

### محاسبه بازده استخراج

راندمان استحصال زعفران از تقسیم وزن کلاله‌های خشک شده زعفرانبر وزن کلاله های تر اولیه ضرب در ۱۰۰ بدست آمد. از تقسیم وزن عصاره خشک بر وزن ماده اولیه مقدار کل ماده خشک عصاره استخراج شده محاسبه و به صورت درصد بیان شد (خانی پور و همکاران، ۱۳۸۶).

### اندازه‌گیری میزان ترکیبات آنتوسیانینی کل

اندازه‌گیری آنتوسیانین به روش pH افتراقی مطابق روش wrosotad (۱۹۷۶) انجام گرفت. به این منظور از دو بافر با- (KCL) (HCL) pH=۱/۵ و ۴/۵ (استات سدیم) استفاده شد. نمونه با بافرها به حجم رسیدند سپس در دو طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر میزان جذب یکبار با بافر ۱ و بار دیگر با بافر ۲ قرائت شد. آنتوسیانین غالب سیانیدین<sup>۳</sup>- گلیکوزید می‌باشد (Giusti & Wrolso tad 2001) و طول موج حداکثر آن ۵۲۰ نانومتر است. میزان آنتوسیانینها طبق رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$A = (A_{\lambda_{vis\ max}} - A_{\lambda_{700}}) \text{ pH} = 1 - (A_{\lambda_{vis\ max}} - A_{\lambda_{700}}) \text{ pH} = 4/5$$

$$A = A \times Mw \times DF \times 1000 / \epsilon \times L$$

A: جذب کل T.O.D: با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت

شرکت فارماسیا انگلستان مدل فارماسیال کی-بی-نوا اسپکت Π از اختلاف جذب بین دو pH=۴/۵ و pH=۱، Mw، بدست آمد: جرم ملکولی سیانیدین<sup>۳</sup>- گلیکوزید (۴۴۹/۲ گرم بر مول)، ε: جذب مولی سیانیدین<sup>۳</sup>- گلیکوزید (۲۶۹۰۰)، DF: فاکتور رقت، L: طول سل

### اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل به روش فولین سیوکالچو انجام گرفت. در این روش مقدار کل ترکیبات فنلی براساس یک ترکیب فنلی انتخاب شده، بیان می‌گردد و در اغلب مواقع این ترکیب اسید گالیک است. معرف فولین در حضور ترکیبات فنولیک در محلول قلیایی احیا و رنگ آبی تولید می‌کند که شدت جذب آن در طول موج ۷۶۰ nm بیانگر مقدار کل ترکیبات فنلی است.

(al., 2008).

از آنجایی که تا کنون هیچ تحقیقی در خصوص پرچم گل زعفران در ایران انجام نگرفته است لذا هدف از انجام این تحقیق دستیابی به روش مناسب جهت استخراج آنتوسیانینهای دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی از پرچم گل زعفران می‌باشد.

## مواد و روش ها

### مواد

گل زعفران، گونه کروکوس ساتیوس از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی تهیه شد، سپس کلاله و پرچم گلها بلافاصله جدا شد و پرچم‌های جدا شده تحت شرایط محیطی و با استفاده از جریان هوای طبیعی و در سایه خشک شدند. پرچم خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب خانگی به پودر تبدیل شد. نمونه‌های پودر شده در بسته‌های نایلونی به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت بسته‌بندی شده و بسته‌ها در محل تاریک در دمای ۱۸- درجه سلسیوس تا زمان استخراج نگهداری شدند.

### استخراج عصاره

استخراج ترکیبات آنتوسیانینی موجود در پرچم گل زعفران با استفاده از حلال (اتانول اسیدی) تحت فرآیند فراصوت در سه شدت ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد در زمانهای ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه انجام شد.

### استخراج با حلال (روش غرقابی)

نمونه پودر شده و حلال به نسبت ۱ به ۵۰ با هم مخلوط شدند. حلال مخلوط اتانول ۷۰ و اسیدکلریدریک ۱/۵ نرمال به نسبت ۸۵ به ۱۵ سی‌سی بود. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با همزن مغناطیسی در دمای محیط هم زده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و با پمپ خلاء صاف شد. رسوب حاصله تحت همان شرایط دوباره عصاره‌گیری شد. به منظور حذف حلال از عصاره و به حداقل رساندن آسیب به ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی از دستگاه‌تبخیرکننده‌دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت خلاء استفاده شد. در نهایت، با استفاده از آون تحت خلاء عصاره کاملاً خشک شد و عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمون‌ها در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال نگهداری شدند (فرهوش، ۲۰۰۶).

### استخراج با امواج فراصوت

عصاره مطابق روش استخراج به روش غرقابی تهیه شد با این تفاوت که مخلوط نمونه و حلال در معرض امواج فراصوت با فرکانس ثابت ۲۴ کیلوهرتز در دمای محیط در سه زمان ۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه و در سه شدت ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ قرار گرفت. فراصوت با استفاده از دستگاه

1- Heilscher, Germany – UP400S

2- Molar absorbtivity

3- Molecular weight

4- Dilution Factor

جدول ۱- اثر زمان فرآیند فراصوت بر مقدار آنتوسیانینی‌ها، ترکیبات پلی فنولی،  $IC_{50}$  و قدرت احیاءکنندگی آهن

| قدرت احیاءکنندگی آهن III<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | شاخص $IC_{50}$<br>(mg/ml) | پلی فنل کل<br>(mg/ml) | میزان آنتوسیانینی‌ها<br>(mg/ml) | زمان راندمان استخراج (%) | زمان<br>(min) |
|----------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------|
| ۳۵۱/۸ c                                            | ۴۴۴/۷ a                   | ۲۲/۶۷ b               | ۳۴/۰۲c                          | ۴۷/۰۰ c                  | ۵             |
| ۳۸۴/۴ a                                            | ۴۲۰/۴ b                   | ۲۵/۰۶ a               | ۳۸/۷۲ a                         | ۴۷/۹۹b                   | ۱۰            |
| ۳۶۸/۳ b                                            | ۴۲۳/۰ b                   | ۲۲/۷۵ b               | ۳۵/۵۳ b                         | ۴۸/۹۹ a                  | ۱۵            |

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $p < 0.05$ )

داشت ( $p < 0.05$ )، با افزایش زمان میزان استخراج عصاره نیز افزایش یافت بطوریکه راندمان استخراج از ۴۷٪ در زمان ۵ دقیقه به ۴۸/۹۹٪ پس از ۱۵ دقیقه رسید.

همچنین در جدول ۱ مقایسه میانگین اثر زمان بر میزان استخراج ترکیبات آنتوسیانینی، پلی‌فنول کل و میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و قدرت احیاءکنندگی آهن III، نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد زمان بر تمامی این پارامترها اثر معنی‌داری داشته است، به طوریکه امواج فراصوت در زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه باعث افزایش استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از ۳۴/۰۲٪ به ۳۸/۷۲٪، پلی‌فنول کل از ۲۲/۶۷ (mg/ml) به ۲۵/۰۶ (mg/ml) و افزایش احیاءکنندگی آهن III از ۳۵۱/۸ ( $\mu\text{mol/ml}$ ) به ۳۸۴/۴ ( $\mu\text{mol/ml}$ ) و کاهش عدد  $IC_{50}$  از ۴۴۴/۷ به ۴۲۰/۴ میلی‌گرم که به معنی افزایش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد می‌باشد، شد. اما در زمان ۱۵ دقیقه این روند ثابت شد و در برخی موارد کاهش یافت. جدول ۱ نشان می‌دهد زمان ۱۰ دقیقه بیشترین میزان ترکیبات آنتوسیانینی و پلی‌فنول کل را استخراج نمود که در نتیجه بیشترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و احیاءکنندگی آهن نیز داشت. فاکتور زمان مدت انتقال جرم را افزایش می‌دهد، بنابراین روند صعودی استخراج عصاره با افزایش شدت صوت و زمان کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. بهمن آبادی (۱۳۹۰) نشان داد به کاربرد امواج فراصوت اثر بیشتری بر راندمان عصاره‌گیری زرشک نسبت به روش غرقابی (حلال) داشت. سالار باشی و همکاران (۱۳۸۸) بیان داشتند امواج فراصوت عصاره بیشتری را از گیاه بوماداران نسبت به روش غرقابی (حلال) استخراج کرد.

پدرام نیا و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی بهینه‌سازی فرآیند استخراج آنتوسیانین زرشک در حضور امواج فراصوت نشان دادند با کاربرد امواج فراصوت در استخراج آنتوسیانین زمان فرآیند کاهش و سرعت آن افزایش یافت.

### اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH<sup>۱</sup>

برای اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد آنتی‌اکسیدان‌ها از رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده می‌شود (Singer et al., 2007). DPPH، ۲ و ۲ دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (۲ و ۱- picrylhydrazyl) یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش می‌باشد که با احیاء شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی‌رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد.

### اندازه‌گیری قدرت احیاءکنندگی آهن III (روش FRAP<sup>۲</sup>)

اندازه‌گیری قدرت احیاءکنندگی آهن III: برای ارزیابی قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها از روش‌های FRAP<sup>۲</sup> و تیوسانات استفاده شد (Benzie & Strain, 1996). آزمون FRAP<sup>۲</sup> آزمون سریعی، قابل تکرار و ارزان است که قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات احیاءکننده یون فریک  $Fe^{3+}$  به فرو  $Fe^{2+}$  را به عنوان معیاری از قابلیت آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری می‌کند. در واقع قدرت آنتی‌اکسیدان یک نمونه از طریق توانایی آن در احیاء نمودن آهن  $Fe^{3+}$  و تبدیل آن به  $Fe^{2+}$  و تغییر رنگ از سبز به آبی قابل تشخیص است.

### نتایج و بحث

#### اثر زمان فرآیند فراصوت بر پارامترهای مورد بررسی

جدول ۱ مقایسه میانگین اثر زمان بر پارامترهای مورد بررسی را نشان می‌دهد.

این جدول نشان می‌دهد زمان اثر معنی‌داری بر بازده استخراج

1-2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl

2-Ferric reducing activity of plasma

3- Ferric Reducing Activity of Plasma

جدول ۲- اثر شدت صوت بر پارامترهای مورد بررسی

| قدرت احیاء کنندگی<br>آهن III<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | شاخص $\text{Ic}_{50}$<br>( $\text{mg/ml}$ ) | پلی فنل کل<br>( $\text{mg/ml}$ ) | میزان رنگ<br>( $\text{mg/ml}$ ) | راندمان استخراج<br>(%) | شدت (%) |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------|
| ۲۸۵/۵ d                                                | ۵۱۵/۸ a                                     | ۱۶/۶۱ d                          | ۲۸/۵۱ d                         | ۳۷/۲۰ d                | ۰       |
| ۳۴۶/۷ c                                                | ۴۵۲/۱ b                                     | ۲۴/۲۰ c                          | ۳۲/۱۶ c                         | ۴۸/۷۰ c                | ۲۰      |
| ۴۱۴/۴ b                                                | ۴۰۲/۲ c                                     | ۲۵/۸۱ b                          | ۳۷/۴۸ b                         | ۵۱/۸۴ b                | ۶۰      |
| ۴۲۶/۱ a                                                | ۳۴۷/۴ d                                     | ۲۷/۳۶ a                          | ۴۶/۲۱ a                         | ۵۴/۱۰۰ a               | ۱۰۰     |

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $p < 0.05$ )

خود رسیدند.

شدت صوت بر میزان راندمان عصاره گیری، احتمالاً به دلیل نیروی برشی ایجاد شده و محتوای انرژی بالای این امواج و تأثیر آنها در شکستن و متلاشی کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات آنها به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم باشد، امواج فراصوت همچنین سبب کاهش اندازه ذرات می‌شوند که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال افزایش می‌یابد (lee *et al.*, 2007)، حیدری مجد و همکاران (۱۳۹۱) بیان کردند که روش فراصوت ترکیبات فنولیک بیشتری را از گیاه پونه گاوی نسبت به روش غرقابی استخراج کرد و دلیل آن را استرس برشی حاصل از امواج فراصوت بر روی ترکیبات فنولیک بیان نمودند. در پژوهش انجام شده بر روی پوست نارگیل جهت بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک با استفاده از اولتراسونیک نیز چنین نتیجه‌ای مشاهده شد (Rodrigues *at al.*, 2008).

### اثر شدت صوت بر پارامترهای مورد بررسی

جدول ۲ مقایسه میانگین اثر شدت صوت را بر میزان استخراج عصاره نشان می‌دهد. جدول ۲ نشان می‌دهد شدت صوت بر تمام پارامترهای مورد بررسی دارای اثر معنی دار بود، بطوریکه با افزایش شدت صوت از ۰ (نمونه شاهد) به ۶۰٪، موجب افزایش بازده استخراج از ۳۷/۲۰٪ به ۳۷/۸۴٪، استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از ۲۸/۵۱  $\text{mg/ml}$  به ۳۷/۴۸  $\text{mg/ml}$ ، پلی فنول کل از ۱۶/۶۱  $\text{mg/ml}$  به ۲۵/۸۱  $\text{mg/ml}$ ، قدرت احیاء کنندگی آهن III از ۲۸۵/۵  $\mu\text{mol/ml}$  به ۳۴۶/۷  $\mu\text{mol/ml}$ ، کاهش عدد  $\text{Ic}_{50}$  از ۵۱۵/۸ به ۴۰۲/۲ میلی گرم شد. جدول ۲ نشان می‌دهد، شدت صوت ۱۰۰ درصد در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی داری بیشترین اثر را بر روی پارامترهای مورد بررسی ایجاد نمود، بطوریکه در شدت صوت ۱۰۰٪، بازده استخراج (۵۴/۱۰۰٪)، استخراج ترکیبات آنتوسیانینی (۴۶/۲۱  $\text{mg/ml}$ )، پلی - فنول کل (۲۷/۳۶  $\text{mg/ml}$ )، قدرت احیاء کنندگی آهن III (۴۲۶/۱  $\mu\text{mol/ml}$ )، شاخص  $\text{Ic}_{50}$  (۳۴۷/۴  $\text{mg}$ ) به بیشترین مقادیر

جدول ۳- اثر متقابل زمان و شدت صوت بر پارامترهای مورد بررسی

| قدرت احیاء کنندگی آهن<br>III<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | شاخص $\text{Ic}_{50}$<br>( $\text{mg/ml}$ ) | پلی فنل کل<br>( $\text{mg/ml}$ ) | میزان رنگ<br>( $\text{mg/ml}$ ) | راندمان استخراج (%) | زمان<br>(min) | شدت (%) |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------|---------|
| ۲۸۵/۵ j                                                | ۵۱۵/۸ a                                     | ۱۶/۶۱ h                          | ۲۸/۵۱ h                         | ۳۷/۲۰ g             | ۰             | ۰       |
| ۲۹۳/۴ i                                                | ۴۶۷/۳ b                                     | ۲۲/۸۳ g                          | ۲۹/۴۲ g                         | ۴۵/۹۷ f             | ۵             |         |
| ۳۹۸/۱ g                                                | ۴۳۳/۰ d                                     | ۲۶/۸۹ c                          | ۳۳/۷۳ fe                        | ۴۸/۸۴ e             | ۱۰            | ۲۰      |
| ۳۴۸/۷ h                                                | ۴۵۶/۰ c                                     | ۲۲/۹ g                           | ۳۳/۳۳ f                         | ۵۱/۲۸ d             | ۱۵            |         |
| ۴۰۳/۵ f                                                | ۴۳۰/۰ d                                     | ۲۳/۸۸ f                          | ۳۳/۹۶ e                         | ۵۱/۴۳ d             | ۵             |         |
| ۴۲۲/۹ c                                                | ۳۹۷/۱ e                                     | ۲۷/۵۴ b                          | ۴۳/۸۱ c                         | ۵۱/۴۸ d             | ۱۰            | ۶۰      |
| ۴۱۶/۷ e                                                | ۳۷۹/۷ f                                     | ۲۶/۰۱ d                          | ۳۴/۶۷ d                         | ۵۲/۶۰ c             | ۱۵            |         |
| ۴۲۴/۹ b                                                | ۳۶۵/۸ g                                     | ۲۷/۳۸ b                          | ۴۴/۲۰ c                         | ۵۳/۳۹ b             | ۵             |         |
| ۴۳۱/۱ a                                                | ۳۳۵/۷ h                                     | ۲۹/۲۲ a                          | ۴۸/۸۳ a                         | ۵۴/۴۳ a             | ۱۰            | ۱۰۰     |
| ۴۲۲/۱ d                                                | ۳۴۰/۵ h                                     | ۲۵/۴۹ e                          | ۴۵/۶۰ b                         | ۵۴/۴۸ a             | ۱۵            |         |

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $p < 0.05$ )

## اثر متقابل زمان و شدت صوت بر پارامترهای مورد بررسی

جدول ۳ اثر متقابل زمان و شدت امواج فراصوت بر میزان استخراج عصاره را نشان می‌دهد. این جدول نشان می‌دهد اثر متقابل زمان و شدت صوت، با اطمینان ۹۵ درصد دارای اثر معنی دار بر بازده عصاره استخراجی می‌باشد، با افزایش زمان و شدت صوت مقدار استخراج عصاره حاصله افزایش یافت. نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که شرایط بهینه برای استخراج عصاره زمان ۱۵ دقیقه و شدت صوت ۱۰۰ می‌باشد. تحت این شرایط میزان عصاره استخراجی ۵۴/۴۸ درصد عصاره به ازای پنج گرم از پودر اولیه می‌باشد.

جدول ۳ مقایسه میانگین همچنین اثر متقابل زمان و شدت امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات آنتوسیانینی، پلی فنول کل، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن را نشان می‌دهد. این جدول نشان می‌دهد با افزایش زمان و شدت صوت از ۵ تا ۱۰ دقیقه پارامترهای مذکور افزایش یافتند، اما در زمان ۱۵ دقیقه این روند ثابت شد و در برخی موارد کاهش یافت. شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتوسیانینی، پلی فنول کل و افزایش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و احیاکنندگی آهن III، زمان ۱۰ دقیقه و شدت صوت ۱۰۰ درصد بود. تحت این شرایط مقدار آنتوسیانین استخراج شده ۴۸/۸۳ میلی گرم بر میلی لیتر، پلی فنول کل ۳۶/۵۴ mg/ml، قدرت احیا-کنندگی رادیکال DPPH، ۳۳۵/۷ mg/ml و قدرت احیاکنندگی آهن III، ۴۳۱/۱ میکرومول بر لیتر آهن III، به ازای ۵ گرم نمونه بود. تفاوت معنی دار بین نمونه شاهد و نمونه‌های قرار گرفته تحت امواج فراصوت (جدول ۳) بیانگر اثر استرس برشی حاصل از امواج مافوق صوت و شکسته شدن مولکولهای پلیمر بزرگ و در نتیجه استخراج بهتر ترکیبات نسبت به روش غرقابی است. همچنین فاکتور شدت نسبت به فاکتور دیگر تاثیر بیشتری را روی میزان استخراج عصاره نسبت به فاکتور زمان داشته است.

در این بخش نیز دلیل افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولیک، تشدید انتقال جرم ناشی از فروپاشی حبابهای کائوتاسیون در نزدیکی دیواره‌های سلولی است که منجر به تماس بهتر بین حلال و مواد گیاهی می‌شود. به علاوه در زمان فروپاشی حباب‌های کائوتاسیون، یک جریان سریع امواج اولتراسونیک تولید می‌شود که به عنوان یک میکروپمپ عمل کرده و می‌تواند به اجبار حلال را به درون سلول رانده و ترکیبات مورد نظر را حل کند (Albu et al., 2004). در واقع در اثر انتشار امواج صوتی در فاز جامد - مایع، چرخه‌های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد می‌شود که باعث تشکیل حبابهایی شده که این حبابها در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. این عمل باعث نوسان ذرات جامد و مایع شده و تحت عمل اولتراسونیک سرعت پیدا می‌کنند. در نتیجه مواد حل شونده سریعاً از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می‌کنند. علاوه بر این، دیگر اثرات مانند

امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می‌کند. در زمان‌های بالاتر ممکن است به دلیل وقوع اکسایش (به علت قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت) میزان استخراج کاهش یابد (Rostango et al., 2003). همچنین می‌توان چنین بیان کرد که اثر حلال در زمان تماس (زمان استخراج) طولانی موجب استخراج ترکیبات ناخالص می‌شود (Chan et al., 2009).

در بررسی تأثیر امواج فراصوت بر میزان استخراج اسید کارنوسیک از گیاه زمراری، تا زمان ۱۵ دقیقه در میزان استخراج افزایش مشاهده شد اما در بازه زمانی ۱۵ تا ۶۰ دقیقه افزایش کمی در میزان استخراج گزارش شد (Albu et al., 2004). Ma و همکاران (۲۰۰۸) استخراج هیسپریدین را از پوست Citrus reticulata به کمک امواج فراصوت بررسی کردند، نتایج آنها نشان داد که بازده استخراج برای هر سه فرکانس ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ کیلوهرتز وابسته به زمان بود و بطور معنی-داری افزایش یافت که این افزایش از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه با شیب زیاد ولی از ۶۰ تا ۱۶۰ دقیقه به آرامی افزایش یافت. بنابراین موثرترین دوره استخراج برای رسیدن به بیشترین بازده استخراج هیسپریدین با هر سه فرکانس حدود زمان ۶۰ دقیقه بود. Gould و همکاران (۲۰۰۷) در انتخاب بهترین زمان استخراج کاتکینها و کافئین از نمونه-ی چای با روش استخراج به کمک اولتراسونیک دینامیک، زمان‌های ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ دقیقه را بررسی نمودند، روند افزایشی در میزان استخراج کاتکینها و کافئین با افزایش زمان مشاهده شد اما به علت کمتر از ۲ درصد بودن تفاوت میزان استخراج ۱۲ دقیقه با ۱۴ و ۱۶ دقیقه، زمان ۱۲ دقیقه به عنوان بهترین زمان انتخاب شد. Rodrigues (۲۰۰۸) در تحقیقی نشان داد با افزایش مدت زمان استخراج (۲۰ تا ۶۰ دقیقه) تفاوت معنی‌داری در استخراج ترکیبات فنولیک دیده نمی‌شود. او بیان کرد اشباع شدن حلال با ترکیبات استخراج شده موجب صفر شدن شیب غلظت و متوقف شدن اثر حلال می‌شود.

در بهینه‌سازی ترکیبات فنولی از سبوس گندم به کمک فراصوت، (Wang et al., 2008) نشان دادند میزان ترکیبات فنولی از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه به طور معنی‌داری افزایش یافت ولی از ۳۰ تا ۵۰ دقیقه تقریباً ثابت بود.

با توجه به نتایج جدول ۳، هر دو فاکتور زمان و شدت صوت دارای اثر معنی داری بر افزایش میزان ترکیبات آنتوسیانینی، پلی فنول کل، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن III عصاره داشته است. این بدان معنی است که فراصوت اثر بیشتری بر روی افزایش میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره نسبت به روش حلال داشته است ( $p < 0.05$ ). نتایج نشان داد با افزایش میزان ترکیبات فنولیک میزان  $IC_{50}$  نیز کاهش یافت همچنین فاکتور شدت

نتیجه گرفت هر دو فاکتور زمان و شدت صوت دارای اثر معنی‌داری بر پارامترهای مورد بررسی می‌باشند، زمان به تنهایی فاکتور موثری جهت تغییر در بازده استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی نیست. فاکتور شدت نسبت به فاکتور زمان تاثیر بیشتری را روی میزان استخراج ترکیبات آنتوسیانینی، پلی فنول کل، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن III عصاره داشت. با اینکه شدت اولتراسونیک ۱۰۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه بالاترین راندمان استخراج را ایجاد نمود اما تفاوت معنی داری را با زمان ۱۰ دقیقه نداشت لذا در این پروژه بهترین شرایط استخراج ترکیبات آنتوسیانینی، از نظر میزان ترکیبات پلی فنول کل، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و احیا کنندگی آهن III عصاره، شدت ۱۰۰٪ و زمان ۱۰ دقیقه بود.

نسبت به فاکتور دیگر تاثیر بیشتری را بر روی میزان ترکیبات آنتوسیانینی، پلی فنول کل، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن III عصاره نسبت به فاکتور زمان داشته است.

## نتیجه گیری

پرچم گل زعفران بواسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات آنتوسیانینی و کارتنوئیدی دارای پتانسیل رنگ و آنتی‌اکسیدانی بالایی هست. باتوجه به غنی بودن پوشش گیاهی شمال شرق کشور از نظر سطح زیر کشت و تولید زعفران، اثرات نامطلوب رنگ و آنتی اکسیدان‌های شیمیایی و با در نظر گرفتن خواص دارویی و مغذی متعدد گرده، می‌توان پرچم گل زعفران را به عنوان یک منبع رنگی- آنتی‌اکسیدانی طبیعی جدید در صنایع غذایی و دارویی معرفی نمود. باتوجه به یافته‌های بدست آمده در این پژوهش می‌توان چنین

## منابع

- بصیری، ش.، شهیدی، ف.، کدخدایی، ر.، فرحوش، ر.، برسی‌تائیرامواجفراصوتوروشهایپیش فراوری براستخراجروغن از هسته‌ها، ۱۳۹۰، فصلنامه علوم و صنایع غذایی دوره ۸، شماره ۳۱، ص. ۱۲۲-۱۱۵.
- بهمن آبادی، ج.، ۱۳۹۰، بهینه سازی استخراج عصاره زرشک توسط فناوری فراصوت به کمک روش سطح پاسخ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.
- بی نام، ۱۳۸۹. آمارنامه کشاورزی. سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸.
- پدرام نیا، ا.، شریفی، ا.، توکلی پور، ج. ۱۳۸۹. بهینه سازی فرآیند استخراج آنتوسیانین زرشک در حضور امواج فراصوت. مجله علوم و فناوری غذایی. ۴۵-۵۲.
- حسین‌زاده، ح.، و همکاران، بررسی اثر ضد تومور و سیتوتوکسیسیته کلاله و گلبرگ زعفران به روش دیسک سیب زمینی و میگوی آب شور، ۱۳۸۴، فصلنامه گیاهان دارویی، سال چهارم، شماره پانزدهم.
- حیدری مجد، م.، مرتضوی، ع.، اصیلی، ج.، بلوریان، ش.، آرمین، م.، عبدالشاهی، آ.، ۱۳۹۱، بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه پونه گاوی با استفاده از دستگاه فراصوت، فصلنامه داروهای گیاهی، سال سوم، شماره ۱، ص. ۱۳-۷.
- خانی پور، ا.، کرامت، ج.، و شکرانی، ر.، ۱۳۸۶، تعیین شرایط بهینه استخراج کارتنوئیدهای گوجه فرنگی، علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال یازدهم، شماره چهلیم (ب). ۲۹۶-۲۸۹.
- خانی پور، ا. ۱۳۸۷. کاربرد کارتنوئیدهای استخراجی از گوجه فرنگی در مواد غذایی حرارت دیده و سرد و بررسی پایداری آن در طول زمان نگهداری، مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی، ۲۲-۱۴.
- خنافری، آ.، منسوبی، م. و اربابیان، ص.، ۱۳۸۸، بررسی توان تولید آنتوسیانین در ریزوبیوم در حالت زندگی همزیست و آزاد، فصلنامه دانش میکروبی شناسی، سال اول، شماره ۲.
- سالار باشی، د.، ۱۳۸۸، بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی گیاه بوماداران، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار.
- سپهری فر، ر.، حسنلو، ط.، بررسی ترکیبات پلی فنلی، آنتوسیانین ها و فلاونوئیدهای تام و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی قره قاط (*Vaccinium martostaphylos* L.) جمع آوری شده از چهار منطقه مختلف ایران، فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۳۸۸، سال نهم، دوره اول، شماره مسلسل سی و سوم. ۷۴-۶۶.
- سعادت‌مند، ج.، دارایی، ش.، آبان ۱۳۸۷. خواص درمانی گرده زنبور عسل: روش های جدید جمع آوری و فرآوری اطلس گرده های زنبور عسل، انتشارات نوپردازان هگمتان.
- مه‌دوی خزاعی، ک.، جعفری، م.، قربانی، م.، همتی کاخکی، ع. ۱۳۹۳. بهینه سازی استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران به روش سطح پاسخ. نشریه

پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، جلد ۳، شماره ۱، صفحات ۵۰-۳۷.

همتی کاخکی، ع.، ۱۳۸۹، بهینه سازی عوامل موثر بر تولید رنگ خوراکی از گلبرگ زعفران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز خراسان بهمن آبادی، ج.، ۱۳۹۰، بهینه سازی استخراج عصاره زرشک توسط فناوری اولتراسوند به کمک روش سطح پاسخ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. 2004. Potential for the use of Ultrasound in the Extraction of Antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the Food and Pharmaceutical Indust. *J Ultrasonic Sonochemistry*, 11, 261.

Arráz-Román, D., Zurek, G., Bässmann, C., Almaraz-Abarca, N., Quirantes, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez. 2007. A. Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal Bioanal Chem. Nov:389(6):1909-17.*

Basiri, S., Shahidi, F., Kadkhodaei, R., and Farhoosh, R. 2011. An investigation on the effect of ultrasound waves and pretreatment methods on the extraction of oil from pomegranate seeds. *J of Food Science and Technology*, 8(3): 115-122.

Benzie, I.F.F., and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76 Gu, Xungang, Cai, Jibao, Zhang, Zhengzhu, Su, Qingde. 2007. Dynamic Ultrasound-Assisted Extraction of Catechins and Caffeine in Some Tea Samples. *J Annali di Chimica*, 97 (5-6): 321 – 330.

Bridle, P., & Timberlake, C. F. 1997. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chemistry*, 58 (1-2): 103-109.

Burin, V.M., Rossa, P.S., Ferreira-Lima, N.E., Hillmann, M. C. R., Boirdignon-Luiz M.T. 2013. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology* 2011, 46, 186–193

Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., and Parenti, A. 2000. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *J Food Chemistry*, 71: 553–562.

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M. and Ho, C. W. 2009. Optimisation extraction conditions for phenolic compounds from limaupurut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal for extraction of tannins. Journal of Chemical Ecology*, 19 (4): 613-621.

Farhoosh, R., and Moosavi, S.M.R. 2006. Determination of carbonyl value in rancid oils: a critical reconsideration. *Journal of Food Lipids*. 13: 298–305.

Fawkeya, A., Abdel-Monem A., 2011. Estradiol, Esteriol, Estrone and Novel Flavonoids from Date Palm Pollen. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(8): 606-614.

Fernandes, F.A.N., Izabel Gallão, M. A., Rodrigues, S. 2009. Effect of osmosis and ultrasound on pineapple cell tissue structure during dehydration. *J Food Engineering Volume 90, Issue 2, Pages 186–190.*

Giusti, M. monica and Wrolstad Ronald E. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-VIS Spectroscopy, *Current Portocols in Food Analytical Chemistry F2.2.1-F2.2.13.*

Gould, K., Davies, K., & Winefield, C. 2008. *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*, Springer, New York.

Harbourne, N., Marete, E., Jacquier, J. C., & O'Riordan, D., 2013, Stability of phytochemicals as sources of anti-inflammatory nutraceuticals in beverages: a review. *Food Research International*, 50 (2): 480-486.

Iannuzzi, J (1993) Pollen: food for honey bee and man? III. *American Bee Journal*. 133(8): 557–563.

*J Agric Food Chem*. Oct 18;54(21):8346-51.

Jiménez, A., Beltrán, G., Uceda, M. 2007. High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *J Ultrason Sonochem*. Sep;14(6):725-31.

Kirca, A., Auzkan, M., & Cemeroulu, B. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101 (1): 212-218.

Lee, E., Wylie, E., Metcalf, C. 2007. Ultrasound imaging features of radial scars of the breast, *J Australasian Radiology*, 51(3): 240–245.

Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G., Liu, D. 2008. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *J Ultrason Sonochem*. 15(3): 227-32.

Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. 1996. The uses of ultrasound in food technology. *J Ultrason Sonochemistry*, Volume 3, Issue 3, November 1996, Pages S253–S260.

Moreira, L. Dias, L. G., Pereira, J., Estevinho, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *J. Food and Chemical Toxicology*. (46): 3482–3485.

Negri, G., Weinstein Teixeira, E., Alves, M. L., Moreti, A., Otsuk, I., Borguini, R., and Salatino, A. 2011. *J. Agric. Food Chem*. 59 (10): 5516–5522.

Rodrigues, S., Pinto, G. A. S. and Fernandes, F. A. N. 2008. Optimization of ultrasound extraction of



- phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *J Ultrasonics Sonochemistry*, 15(1): 95-100.
- Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J Chromatography A*, 1012: 119-128.
- Siger, A., Nogala-kalucka, M., and Lampart-Szczapa, E. 2007. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J of Food Lipids*. 15:137-149.
- Van Sumere, C., VandeCastele, K., De Loose, R., & Heursel, J. 1985. Reversed phase HPLC analysis of flavonoids and the biochemical identification of cultivars of evergreen Azalea. *The biochemistry of plant phenolics*, 25: 17-43.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303.
- wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. and Li, X. 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *J Food Chemistry* 106(2): 804-810.
- Wrolstad R.E. 1976. Color and pigment analysis in fruit products. Station Bull. 621. Agric. Exp. Sta. Oregon State University.
- Yoshida, K., Kondo, T., & Goto, T. 1991. Unusually stable monoacylated anthocyanin from purple yam (*Dioscorea alata*). *Tetrahedron letters*, 32 (40): 5579-5580.
- Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., Hu, X. 2006. Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin.



## Study of anthocyanin and antioxidant compounds derived ethanol extract saffron flag with the help of ultrasound technology

R.Rouhani<sup>1</sup>, S. Eyenafshar<sup>2\*</sup>, R. Ahmadzadeh<sup>3</sup>

Received: 10-09-2013

Accepted: 29-09-2014

### Abstract

Sepals and petals are byproducts from saffron production process that waste without any use in Iran. These byproducts containing a lot of anthocyanin and natural antioxidants. The aim of this study is determine efficiency of extraction and measurement of antioxidant activity and anthocyanin pigments of pollen and anther of saffron flower, using mixed solvent of ethanol and hydrochloric acid 1.5 N (85:15) by ultrasonic waves. Therefore, the time factors (5, 15, 25 minutes) and sound intensity (20, 60 and 100%) were used. The results showed that the most efficient extraction of samples (54/48%) was extracted in 15 minute and 100% of sound intensity, and the maximum measure of anthocyanin compounds (48.83 mg/ml), total phenolic compounds (36.54 mg/ml), power of reviving the anti-radical DPPH activity of the extracts (335.7 mg/ml) and the power of scavenging Fe III (431.1 μmol/lit Fe III), the best sample in all of the exams was extracted in 10 minutes and 100% of sound intensity. So, the optimized situation for extraction of anthocyanin compounds by ultrasound waves was time 15 min and 100% about sound intensity.

**Keywords:** Anthocyanin, Spectroscopy, Stamen of Saffron, Antioxidant activity, Ultrasound

1 And 2 - MS.c Student and Assistant Professor, Food Science and Technology, Azad University, Ghouchan branch, Ghouchan, Khorasan Shomali, Iran.

2- Assistant Professor, Research Center Of Agriculture And Natural Resources, Iran.

(\* - Corresponding Author Email: Soodabeheyn@yahoo.com)