

## بهینه‌سازی استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران به روش سطح پاسخ

کتایون مهدوی خزاعی<sup>۱</sup>، سید مهدی جعفری<sup>۲\*</sup>، محمد قربانی<sup>۲</sup>، عباس همتی کاخکی<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

\*نویسنده مسئول (smjafari@gau.au.ir)

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- استادیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

### چکیده

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۵/۰۴

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۳/۱۳

#### واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین

استخراج

روش سطح پاسخ

گلبرگ زعفران

در این پژوهش، شرایط بهینه استخراج آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران بوسیله‌ی حلال اتانول اسیدی تعیین شد. متغیرهای مستقل شامل نسبت حلال به نمونه (۲۰ تا ۸۰ میلی‌لیتر حلال بر گرم نمونه)، درصد اتانول (۷۵ تا ۲۵ درصد)، دما (۲۵ تا ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۸ تا ۲۴ ساعت) بودند. روش سطح پاسخ جهت تعیین شرایط بهینه استخراج با هدف بالاترین میزان آنتوسیانین (بر مبنای سیانیدین تری‌گلیکوزید) مورد استفاده قرار گرفت. آزمون‌ها بر مبنای طرح باکس بنکن و چهار متغیر مستقل طراحی شدند. ضرایب واریانس به‌دست آمده نشان داد که اثر دما بر میزان آنتوسیانین استخراج شده نسبت به دیگر عوامل در سطح اطمینان ۹۵ درصد شاخص‌تر بود. نسبت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر حلال به نمونه، اتانول ۲۵/۰۲ درصد، دمای ۲۵/۸ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۲۴ ساعت به عنوان شرایط بهینه استخراج تعیین شدند. در شرایط بهینه، مقدار ۱۶۰۹/۱۱ میلی‌گرم آنتوسیانین به ازای هر لیتر عصاره گلبرگ زعفران استحصال شد. معادله‌ی درجه دوم کاسته شده بیانگر اثر مستقل متغیرهای فرآیند در استخراج آنتوسیانین از عصاره‌ی گلبرگ زعفران بود.

### مقدمه

فنیل پروپانوید<sup>۱</sup> ساخته می‌شود (Castaoveda-  
(Ovado et al., 2009).

گیاه زعفران (*Crocus sativus*) که از مادگی گل آن، گرانبهاترین ادویه جهان استحصال می‌شود (Kafi, 2006)، دارای گل‌های بنفش رنگی است که گلبرگ‌های آن پس از جدا کردن مادگی، به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شوند. گلبرگ زعفران به طور متوسط ۸۶/۴ درصد وزن تر یا ۹۶/۳۶ درصد وزن خشک گل را تشکیل می‌دهد (همتی و همکاران، ۱۳۷۳). با توجه به بالا بودن میزان تولید سالانه

امروزه استفاده از رنگ‌های طبیعی در صنعت غذا به دلیل آگاهی از اثرات زیانبار اغلب رنگ‌های سنتزی افزایش یافته است. آنتوسیانین جایگزین مناسبی برای رنگ‌های سنتزی است زیرا علاوه بر دارا بودن رنگ جذاب و درخشان، خواص ضدسرطانی و ضدویروسی آن نیز ثابت شده است (Andersen et al., 2010). این رنگدانه‌ی طبیعی متعلق به دسته‌ی بزرگی از ترکیبات شیمیایی به نام فلاونوئیدها بوده که طی چرخه‌ی

1- Phenylpropanoid pathway

فلاوونوئیدها، پروتئین‌ها و یون‌های فلزی بر پایداری آن موثرند (Stintzing & Carle, 2004).

استخراج یکی از پرکاربردترین فرایندهای صنایع غذایی است که به کمک آن ترکیبات مطلوب و مورد نظر بافت مواد غذایی جدا می‌شوند (Barzana, Rubio *et al.*, 2002). در استخراج آنتوسیانین‌ها حلال‌های آبی-الکلی<sup>۵</sup> از جمله اتانول و متانول مورد استفاده قرار می‌گیرند. فرایند استخراج آنتوسیانین‌ها عموماً در دمای پایین (زیر ۳۰ درجه سانتی‌گراد)، ترجیحاً در شرایط خلأ (جهت به حداقل رساندن تخریب آنتوسیانین‌ها) و در محیط اسیدی صورت می‌گیرد (Gould *et al.*, 2008). در پژوهش صورت گرفته بر روی استخراج آنتوسیانین موجود در عصاره هویج سیاه، مشاهده شد که افزایش pH از ۴/۳ تا ۶ موجب تخریب رنگدانه شده و به طور کلی در pHهای بالاتر از ۵ کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان آنتوسیانین منومری مشاهده شد (Kirca *et al.*, 2007)؛ اسیدکلریدریک همچنین می‌تواند موجب تغییر شکل آنتوسیانین‌ها شود از جمله هیدرولیز آن در شرایط اسیدی در طی تبخیر آن در تبخیرکننده چرخان (با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) (Van Sumere *et al.*, 1985) و یا از دآسیله شدن آنها با اسیدهای آلیفاتیک (در دمای اتاق) جلوگیری نماید (Harbourn *et al.*, 1986). آنتوسیانین‌های آسیله شده دارای پایداری بالاتری نسبت به آنالوگ‌های غیرآسیله‌ی خود می‌باشند (Yoshida *et al.*, 1991; Bridle & Timberlake, 1997). اعمال دما یکی دیگر از عوامل مؤثر در استخراج آنتوسیانین‌هاست. بر اساس معادله انیشتین که بیان‌کننده‌ی تناسب بین ضریب انتشار، با دما و ویسکوزیته دینامیکی می‌باشد افزایش دما (به دلیل کاهش ویسکوزیته دینامیکی) می‌تواند موجب افزایش قابل توجهی در ضریب انتشار و بنابراین افزایش سرعت استخراج آنتوسیانین شود (Cacace & Mazza, 2003) همچنین دماهای بالا موجب دنا توره شدن پروتئین دیواره سلول‌های گیاهی شده و خروج آنتوسیانین از بافت گیاهی آسان‌تر می‌شود (Schwartzberg & Chao, 1982)، اما از طرف دیگر

زعفران در ایران حجم بالایی از این ماده ارزشمند، پس از جدا کردن مادگی، بدون استفاده در طبیعت رها می‌شود. این گلبرگ زعفران حاوی رنگدانه آنتوسیانین، دیگر ترکیبات فلاوونوئیدی و مشتقات گلیکوزیدی آنها می‌باشد. بر اساس پژوهش‌های انجام شده بر گلبرگ زعفران خواص درمانی فراوانی از جمله کاهش‌دهنده فشار خون (Fatehi *et al.*, 2003)، تسکین دهنده (Hosseinzadeh & yonesi, 2002)، خاصیت ضدافسردگی (Kubo & Kinst-Hori, 1999; Moshiri *et al.*, 2006; Akhondzadeh *et al.*, 2007)، و کاهش‌دهنده علائم قبل از قاعدگی زنان<sup>۱</sup> (Agha-hoseini *et al.*, 2008) برای آن معرفی شده است. این پژوهشگران خواص درمانی گوناگون گلبرگ زعفران را مربوط به حضور ترکیب‌های فلاوونوئیدی از جمله آنتوسیانین‌ها و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آنها دانسته‌اند. بر اساس بررسی‌های انجام شده بر گل ۷۰ گونه و ۴۳ زیرگونه گیاه زعفران، آنتوسیانین‌های اصلی موجود در گلبرگ شامل ۳، ۵ دی-اُبتا-گلیکوزید دلفینیدین<sup>۲</sup> (بیش از ۳۰ درصد از کل آنتوسیانین موجود)، ۳-اُبتاروتینوزید دلفینیدین<sup>۳</sup> و ۳، ۵ دی-اُبتا-گلیکوزید پتونیدین<sup>۴</sup> (هر یک به میزان بیش از ۱۰ درصد کل آنتوسیانین موجود) و انواع دیگر دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین (هر یک به مقادیر کمتر از ۱۰ درصد)، شناسایی کردند (Norbark *et al.*, 2002). دیگر بررسی‌های صورت گرفته بر روی ترکیبات فلاوونوئیدی گلبرگ زعفران، غالب بودن آنتوسیانین نوع دلفینیدین را تأیید کرده است (Williams *et al.*, 1986 & Garido *et al.*, 1987).

اغلب آنتوسیانین‌ها پس از جدا شدن از ساختار ماده غذایی نسبت به تخریب بسیار حساس هستند (Giusti & Wrolstad, 2001) و عوامل مختلفی چون ساختار شیمیایی، pH، دمای نگهداری، رطوبت، غلظت، نور، اکسیژن، حلال‌ها و حضور آنزیم‌ها،

- 1- Premenstrual syndrome
- 2- 3-5-o-β- glycoside delphinidin
- 3- 3-5-o-β- rotinoside delphinidin
- 4- 3-5-o-β- glycoside petonidin

5- Hydro-alcoholic

## مواد و روش‌ها

### مواد اولیه

گل زعفران، از مزرعه‌ای مشخص در شرق تربت حیدریه، در خراسان رضوی جمع‌آوری شد. گل‌ها پس از جدا کردن پرچم و مادگی، در اتاقی تاریک و گرم با دمای حدود ۳۵ درجه سانتی‌گراد، در مقابل دمنده (جهت تسریع روند خشک‌شدن و حفظ هر چه بیشتر آنتوسیانین‌ها در طی خشک‌شدن) تا خشک شدن کامل قرار گرفته و طی این مدت، زیر و رو شدند. گل‌های خشک شده با آسیاب خانگی، آسیاب و الک (مش ۱۶) شدند و در ظروف تیره با درب کاملاً بسته، تا انجام آزمون‌های بعدی در یخچال نگهداری شدند.

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از: اتانول ۹۶ درصد، اسید کلریدریک ۳۷ درصد، بافر استات سدیم سه آبه (بافر ۴/۵) و بافر کلرید کلسیم (بافر ۱). تمامی مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت‌های معتبر و با درجه خلوص بالا تهیه شدند. از حلال‌های اتانول اسیدی با درصد اتانول ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد استفاده شد. جهت تهیه حلال‌ها، اتانول ۹۶ درصد و آب مقطر با نسبت حجمی به ترتیب ۱ به ۳، ۱ به ۱ و ۳ به ۱ با یکدیگر مخلوط شدند و pH حلال با اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال تا pH برابر ۲ کاهش یافت. بافر ۱ و ۴/۵ به ترتیب بر اساس روش Giusti و Wrolstad (۲۰۰۱) تهیه شدند.

### بررسی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی گلبرگ زعفران

برخی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی گلبرگ گل زعفران مانند میزان رطوبت، پروتئین، خاکستر کل، قند کل، فیبر کل (AOAC, 2006)، چربی (AOAC, 1959) و نیز آنتوسیانین کل منومری به روش pH افتراقی (Lee et al., 2006) مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

### استخراج

استخراج عصاره گلبرگ زعفران پس از انجام آزمون‌های اولیه لازم جهت به دست آوردن سطوح هر یک از متغیرها، با کمک روش خیساندن طبق پیشنهاد Fuleki و Francis (۱۹۶۸) و با اندکی

نمی‌توان آسیب‌پذیری آسان این رنگدانه در برابر حرارت و تخریب و تبدیل آن به رنگدانه‌های پلیمری قهوه‌ای و یا بی‌رنگ و از بین رفتن رنگ مطلوب عصاره‌ها در اثر فرایند حرارتی را نادیده گرفت (Patras et al., 2010; Pala & Toklucu, 2012; Stintzing & Carle, 2004). علاوه بر نقش افزایش دما بر استخراج و پایداری آنتوسیانین، افزایش غلظت مواد جامد محلول نیز پایداری این رنگدانه را طی استخراج تحت تأثیر قرار می‌دهد به طوری که Kirca و همکاران (۲۰۰۷) نیمه عمر آنتوسیانین منومری موجود در هویج سیاه را در عصاره استخراج شده با درجه بریکس ۱۱ را ۱۶/۷ تا ۵ ساعت و در عصاره‌هایی با درجه بریکس ۶۴ را ۱۴/۴ تا ۲/۳ بیان کرده‌اند. این محققین علت تخریب سریع‌تر آنتوسیانین در عصاره‌ها با غلظت‌های بالاتر را به دلیل واکنش بیشتر بین مولکول‌ها در اثر تماس نزدیک‌تر با یکدیگر دانسته‌اند اختلاف غلظت ماده مؤثره موجود در بافت گیاهی و حلال باعث استخراج مواد مؤثره می‌شود و هر چه این اختلاف غلظت بیشتر باشد، خروج مواد سریع‌تر و به مقدار بیشتر انجام می‌شود. فرایند استخراج تا هنگام ایجاد تعادل بین غلظت هر یک از ترکیبات، در بافت گیاهی با غلظت آنها که در حلال حل شده، انجام می‌شود و تعادل ایجاد شده ثابت تعادلی انتشار<sup>۱</sup> تابعی از خصوصیات حلال و نوع حلال، حجم و غلظت حلال، خصوصیات حل شونده و دما است (Gertenbach, 2001).

در این پژوهش از بین پارامترهای مؤثر بر راندمان استخراج با حلال اثر متغیرهای نسبت حلال به حل شونده (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، زمان استخراج (بر حسب ساعت)، درصد اتانول در حلال و دمای استخراج (بر حسب درجه سانتی‌گراد) بر میزان آنتوسیانین منومری استخراج شده از گلبرگ زعفران مورد بررسی قرار گرفته و شرایط بهینه با هدف بیشترین میزان استخراج آنتوسیانین منومری بر مبنای سیانیدین تری گلیکوزید و به کمک روش سطح پاسخ (RSM<sup>۲</sup>) تعیین شد.

1- Equilibrium distribution constant  
2- Respond Surface Methodology

بود. معنادار بودن آماری عبارت‌ها در معادله‌ی رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) مورد بررسی قرار گرفت. جهت برازش داده‌ها و ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار دیزاین اکسپرت<sup>۲</sup> نسخه‌ی (Statease Inc.), Minneapolis, USA استفاده شد.

## نتایج و بحث

### ویژگی‌های فیزیکی‌وشیمیایی

در جدول ۱ برخی ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی گلبرگ گل زعفران، روش اندازه‌گیری و مقادیر به دست آمده ارائه شده است.

میزان آنتوسیانین منومری کل موجود در نمونه گلبرگ برابر ۱۷۱۲/۱۹ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بر مبنای سیانیدین‌تری‌گلیکوزید به‌دست آمد (جدول ۱). Lee و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی مقدار کل آنتوسیانین منومری موجود در دیگر منابع طبیعی آنتوسیانین اندازه‌گیری شده به روش pH افتراقی و بر مبنای سیانیدین‌تری‌گلیکوزید را گزارش کردند. این محققان مقدار آنتوسیانین عصاره قره‌قات<sup>۳</sup> را برابر ۱۳/۶، شراب قرمز<sup>۴</sup> ۲۰/۱۶، رنگدانه‌های طبیعی<sup>۵</sup> ۶۴۰/۸، عصاره توت فرنگی ۶۳/۶، عصاره تمشک<sup>۶</sup> ۳۳۶/۷ و نوعی توت سیاه<sup>۷</sup> برابر ۳۰۰۶/۸ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گزارش شده است. Kirca و همکاران (۲۰۰۷) نیز مقدار آنتوسیانین موجود در هویج سیاه را برابر ۱۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن هویج تازه گزارش کردند. در مقایسه آنتوسیانین کل گلبرگ زعفران با آنتوسیانین موجود در منابع مذکور، می‌توان گفت گلبرگ زعفران منبع بسیار غنی از انواع آنتوسیانین‌هاست. همتی و همکاران (۱۳۷۳) نیز در تحقیقی مشابه که بر روی آنتوسیانین گلبرگ زعفران انجام داده‌اند به مقایسه میزان آنتوسیانین موجود در گلبرگ زعفران (برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم) با دیگر منابع آنتوسیانینی پرداخته و عنوان کردند که

اصلاحات صورت گرفت. شرایط هر آزمون از قبیل دما، نسبت حلال، درصد اتانول در حلال و زمان بر اساس سطوح متغیرهای پیش بینی شده در طرح مطابق جدول ۲ در نظر گرفته شد. آنتوسیانین موجود در عصاره حاصل از یک بار صاف کردن نمونه با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و به کمک خلاء، به روش pH افتراقی اندازه‌گیری و محاسبه شد.

### اندازه‌گیری آنتوسیانین گلبرگ زعفران به روش pH افتراقی

میزان آنتوسیانین عصاره صاف شده، به کمک رقیق‌سازی نمونه در بافرهای ۱ و ۴/۵ و قرائت جذب آن در طول موج‌های ۷۰۰ و ۵۲۰ نانومتر بر اساس روش pH افتراقی به کمک اسپکتروفتومتر (دو پرتویی فرا بنفش-مرئی Shimadzu مدل UV-160A ژاپن) صورت گرفت (Lee et al., 2008).

مقدار جذب نمونه (A) به کمک معادله (۱) و میزان آنتوسیانین منومری بر حسب میلی‌گرم در لیتر عصاره به کمک معادله (۲) محاسبه می‌شوند:

معادله (۱)

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700\text{nm}}}) \text{ pH}_{1.0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700\text{nm}}}) \text{ pH}_{4.5}$$

معادله (۲)

میزان آنتوسیانین منومری =  $(A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times L)$   
A: مقدار جذب نمونه،  $A_{\lambda_{\text{vis-max}}}$ : بیشترین جذب به‌دست آمده، MW: وزن مولکولی سیانیدین‌تری‌گلیکوزید (بر اساس گرم بر مول)، DF: فاکتور رقت،  $\epsilon$ : ۲۶۹۰۰ که برابر جذب مولی سیانیدین تری‌گلیکوزی، L: قطر سل اسپکتروفتومتر (بر حسب سانتی‌متر) و ۱۰۰۰ جهت تبدیل گرم به میلی‌گرم می‌باشد.

### تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تخمین اثر چهار متغیر مستقل بر میزان آنتوسیانین استخراج شده از روش سطح پاسخ و طرح باکس بنکن<sup>۱</sup> استفاده شد. آزمون‌ها شامل ۲۹ تیمار با پنج تکرار در نقطه‌ی مرکزی و دو تکرار در هر آزمون

1- Box-benken design

- 2- Design Expert Software
- 3- Cranberry juice cocktail
- 4- Red wine
- 5- Natural colorant
- 6- Raspberry juice
- 7- Elderberry

استخراج به ترتیب دارای بالاترین و پایین‌ترین اثر بر راندمان استخراج بودند.

معادله (۳)

$$\begin{aligned} \text{Anthocyanin} = & 1181.0 - 61.44x_1 \\ & - 120.19x_2 - 73.11x_3 \\ & + 77.31x_4 - 172.13x_1x_3 \\ & - 142.61x_1x_4 - 75.7x_2x_4 \\ & + 91.18x_3x_4 + 92.47x_1^2 \\ & - 50.28x_2^2 \end{aligned}$$

ضریب تبیین برابر ۰/۹۴۸ و ضریب تبیین تنظیم شده برابر ۰/۹۲ به دست آمد. از آن جایی که نزدیک شدن ضریب تبیین به مقدار واحد به معنی برازش مناسب مدل تجربی با داده‌های واقعی است و نیز ضریب تبیین تنظیم شده بالاتر از ۰/۹۰ به معنای درستی و صحت مدل می‌باشد (Koocheki et al., 2009)؛ بنابراین صحت مدل پیش‌بینی شده بر مبنای این دو فاکتور تأیید می‌شود. در شکل ۱ میزان آنتوسیانین پیش‌بینی شده در مدل و مقادیر واقعی به دست آمده طی استخراج مقایسه شده است.

بررسی نمودارهای سطح پاسخ در روش استخراج با حلال

مطابق شکل ۲، در بررسی اثر زمان-دمای استخراج بر راندمان، در درصد اتانول ۵۰ درصد و نسبت حلال ۵۰ میلی‌لیتر بر گرم نمونه، در تمام بازه‌های زمانی، افزایش دما به طور خطی موجب کاهش آنتوسیانین کل منومری شد. از آن جایی که افزایش دما می‌تواند موجب پلیمری شدن و تبدیل آنتوسیانین‌های منومری به رنگدانه‌های قهوه‌ای یا بی‌رنگ شود و رنگدانه‌های پلیمری در مقابل تغییرات pH تغییر رنگ نشان نمی‌دهند و بنابراین قابل اندازه‌گیری به روش pH افتراقی نیستند (Giusti & Wrolstad, 2001). در هر دما، افزایش زمان استخراج تا حدود ۱۸ تا ۲۰ ساعت همراه با کاهش کل آنتوسیانین منومری (به دلیل غالب بودن اثر تخریبی دما بر آنتوسیانین منومری استخراج شده در آن بازه زمانی) و پس از آن تا زمان استخراج ۲۴ ساعت میزان آنتوسیانین منومری ثابت و یا حتی کمی افزایش نشان داد.

میزان این رنگدانه در گلبرگ زعفران بالاتر از بسیاری از رنگ‌دهنده‌های طبیعی است.

تأثیر دما، نسبت حلال، درصد اتانول در حلال و زمان بر میزان استخراج آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین به دست آمده از استخراج<sup>۱</sup> با حلال بر حسب میزان میلی‌گرم سیانیدین‌تری‌گلیکوزید در هر لیتر عصاره، در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از تحلیل واریانس داده‌ها و بر اساس مقادیر F و P مدل درجه دو چند جمله‌ای، مدل مناسب جهت برازش داده‌ها به دست آمد (جدول ۳).  $X_1$ ،  $X_2$ ،  $X_3$  و  $X_4$  متغیرهای مستقل و به ترتیب زمان، دما، درصد اتانول و نسبت حلال به نمونه می‌باشند. همچنین، داده‌های حاصل از تحلیل واریانس نشان داد چهار متغیر در حالت خطی ( $X$ )، ( $P \leq 0.01$ ) دارای اثر معنی دار در مدل بودند. عبارات درجه دو نسبت حلال ( $X_1^2$ ,  $P \leq 0.01$ ) و زمان ( $X_4^2$ ,  $P \leq 0.01$ ) و اثر متقابل همه‌ی متغیرها به جز درصد اتانول-دما ( $X_2X_3$ ،  $P \leq 0.01$ ) و نسبت حلال-درصد اتانول ( $P \leq 0.01$ )، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد معنی دار بودند (جدول ۳).

مدل ارائه شده (معادله ۳) عبارت از معادله درجه دو چند جمله‌ای (رگرسیون) است که پس از حذف ضرایب بی‌معنی و در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارائه شده است. عدد ثابت داده شده، ضریب ثابت مدل می‌باشد.  $\gamma$  نشانگر میزان آنتوسیانین استخراج شده بر حسب میلی‌گرم سیانیدین‌تری‌گلیکوزید در هر لیتر عصاره است. بزرگی ضرایب متغیرها در این چندجمله‌ای صرف‌نظر از مثبت یا منفی بودنشان بیانگر اهمیت ضرایب مربوطه در تغییرات پاسخ (میزان آنتوسیانین) می‌باشند. همان‌طور که در معادله ۳ دیده می‌شود، از بین چهار متغیر مستقل، به طور کلی تنها نسبت حلال به کار رفته دارای اثر مثبت و دیگر متغیرهای مستقل دارای اثر عکس بر میزان آنتوسیانین استخراج شده در شرایط آزمون بودند. همچنین در بین فاکتورهای مذکور، دما و زمان

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی گلبرگ گل زعفران

ویژگی‌ها	نتایج	واحد اندازه‌گیری
پروتئین	۸/۷۳±۰/۰۹	درصد در ماده خشک
چربی	۱۰/۵۲±۰/۰۹	درصد در ماده خشک
فیبر	۱۱/۳۹±۰/۱۱	درصد در ماده خشک
قند کل	۱۳/۰۵±۰/۱۲	درصد در ماده خشک
خاکستر تام	۵/۷۶±۰/۰۰۳	درصد در ماده خشک
رطوبت	۸۷/۱۱±۰/۰۴	درصد در ماده خشک
آنتوسیانین کل منومری	۱۷۱۲/۶۰±۱۹/۲۴	میلی گرم در لیتر عصاره

جدول ۲- نتایج استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران با استفاده از طرح باکس بنکن

شماره آزمون	فاکتورها				مقادیر آنتوسیانین
	X <sub>1</sub> (ساعت)	X <sub>2</sub> (درجه سانتی‌گراد)	X <sub>3</sub> (درصد)	X <sub>4</sub> (میلی لیتر بر گرم)	
	زمان	دما	درصد اتانول	نسبت حلال به نمونه	میلی گرم در لیتر
۱	۸ (-۱)	۴۵ (۱)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۲۴۸/۲۴
۲	۸ (-۱)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۲۰ (-۱)	۱۰۵۰/۰۱
۳	۸ (-۱)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۵۱۱/۲۵
۴	۸ (-۱)	۳۵ (۰)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۱۲۱۴/۴۶
۵	۸ (-۱)	۳۵ (۰)	۷۵ (۱)	۵۰ (۰)	۱۴۱۹/۴
۶	۸ (-۱)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۸۰ (۰)	۱۴۹۵/۵۶
۷	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۱۹۰/۵۴
۸	۱۶ (۰)	۴۵ (۱)	۵۰ (۰)	۲۰ (-۱)	۱۰۱۱/۹۵
۹	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۲۰۲/۰۳
۱۰	۱۶ (۰)	۴۵ (۱)	۷۵ (۱)	۵۰ (۰)	۹۹۳/۶۷
۱۱	۱۶ (۰)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۲۰ (-۱)	۱۱۱۰/۳۴
۱۲	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۲۰۰/۹۵
۱۳	۱۶ (۰)	۲۵ (-۱)	۷۵ (۱)	۵۰ (۰)	۱۲۸۷/۲۹
۱۴	۱۶ (۰)	۴۵ (۱)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۱۱۷۸/۴۷
۱۵	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۱۹۶/۰۴
۱۶	۱۶ (۰)	۴۵ (۱)	۵۰ (۰)	۸۰ (۱)	۱۰۳۵/۰۲
۱۷	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۷۵ (۱)	۸۰ (۱)	۱۱۶۳/۹۴
۱۸	۱۶ (۰)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۸۰ (۱)	۱۴۳۶/۱
۱۹	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۲۰۱/۳۶
۲۰	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۷۵ (۱)	۲۰ (-۱)	۸۵۲/۵۴
۲۱	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۲۵ (-۱)	۲۰ (-۱)	۱۲۱۰/۵۴
۲۲	۱۶ (۰)	۲۵ (-۱)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۱۳۴۰/۹۲
۲۳	۱۶ (۰)	۳۵ (۰)	۲۵ (-۱)	۸۰ (۱)	۱۱۵۷/۲
۲۴	۲۴ (۱)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۲۷۵/۰۹
۲۵	۲۴ (۱)	۳۵ (۰)	۷۵ (۱)	۵۰ (۰)	۹۶۲/۶۵
۲۶	۲۴ (۱)	۴۵ (۱)	۵۰ (۰)	۵۰ (۰)	۱۰۴۲/۲۳
۲۷	۲۴ (۱)	۳۵ (۰)	۲۵ (-۱)	۵۰ (۰)	۱۴۴۶/۲۳
۲۸	۲۴ (۱)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۸۰ (۱)	۱۱۷۵/۲۷
۲۹	۲۴ (۱)	۳۵ (۰)	۵۰ (۰)	۲۰ (-۱)	۱۳۰۰/۱۴

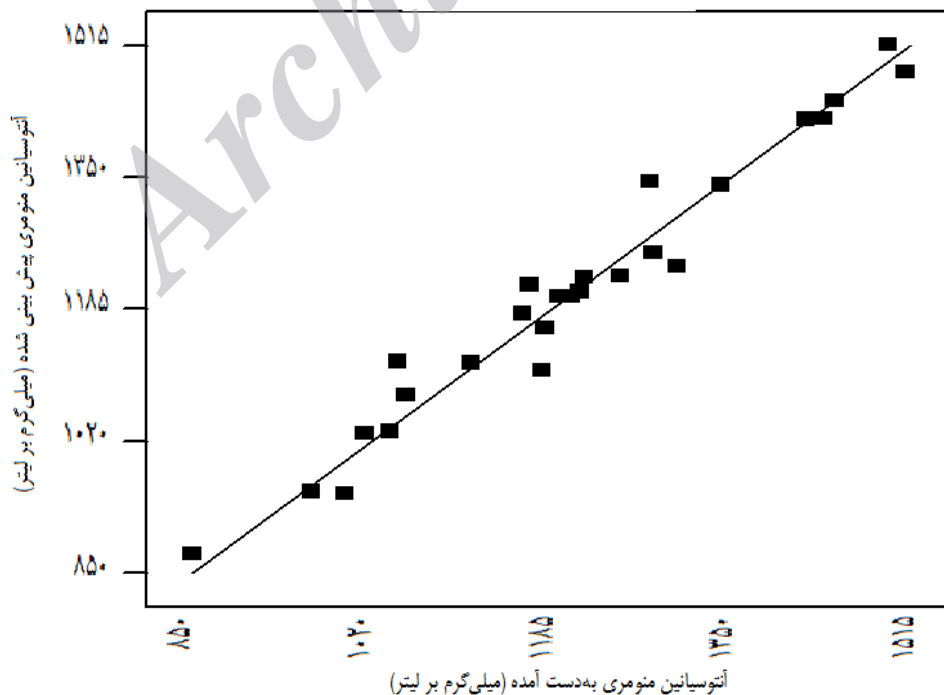
a اعداد داخل پرانتز بیانگر پارامترهای مستقل به صورت کددار می‌باشند.

جدول ۳- جدول فقدان برازش

انحراف معیار	مربع ضریب تبیین	مربع ضریب تبیین تنظیم شده	مربع ضریب تبیین پیش بینی شده	احتمال فقدان برازش با مدل
خطی	۰/۴۸۲۵	۰/۳۹۶۳	۰/۱۸۹۳	<۰/۰۰۰۱
اثر متقابل دو فاکتور	۰/۸۳۶۴	۰/۷۴۵۶	۰/۴۵۷۷	<۰/۰۰۰۱
درجه دو	۰/۹۶۱۶	۰/۹۲۳۲	۰/۷۷۹۵	۰/۰۰۰۲
درجه سه	۰/۹۸۹۴	۰/۹۵۰۴	-۰/۵۱۲۰	۰/۰۰۰۱

جدول ۴- ضرایب رگرسیونی برای میزان آنتوسیانین (میلی گرم در صد میلی لیتر) گلبرگ زعفران در مدل درجه‌ی دو به روش استخراج سنتی

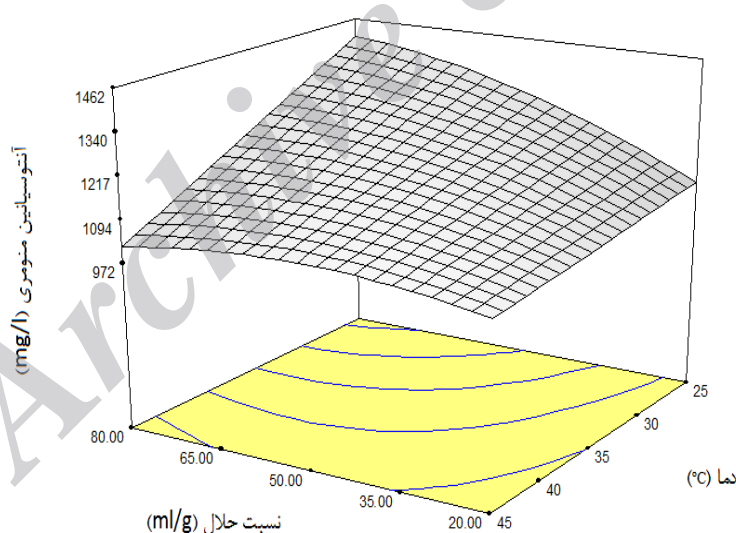
عبارت‌های مدل	ضرایب	انحراف از استاندارد ضرایب	ارزش F	ارزش P
مقدار ثابت	۱۱۹۸/۱۸	۲۰/۰۷	۲۵/۰۵	<۰/۰۰۰۱
X <sub>1</sub> - زمان	-۶۱/۴۴	۱۲/۹۶	۲۲/۴۹	۰/۰۰۰۳
X <sub>2</sub> - دما	-۱۲۰/۱۹	۱۲/۹۶	۸۶/۰۷	<۰/۰۰۰۱
X <sub>3</sub> - درصد اتانول	-۷۳/۴۴	۱۲/۹۶	۳۱/۸۵	<۰/۰۰۰۱
X <sub>4</sub> - نسبت جلال	۷۷/۳۱	۱۲/۹۶	۳۵/۶۱	<۰/۰۰۰۱
	۲۵/۴۶	۱۷/۶۲	۸/۴۵	۰/۰۰۰۲
	۴/۰۳	۱۷/۶۲	۰/۰۵۲	۰/۸۲۲۳
	-۲۶/۳۶	۱۷/۶۲	۲/۲۴	۰/۱۵۶۸
	-۵۳/۸۴	۱۷/۶۲	۰/۳۳	۰/۰۰۸۶
	۷/۵۴	۲۲/۴۴	۰/۱۱	۰/۷۴۱۹
	-۱۷۲/۱۳	۲۲/۴۴	۵۸/۸۴	<۰/۰۰۰۱
	-۱۴۲/۶۱	۲۲/۴۴	۴۰/۳۹	<۰/۰۰۰۱
	-۳۰/۵۴	۲۲/۴۴	۱/۸۵	۰/۱۹۵۹
	-۷۵/۷	۲۲/۴۴	۱۱/۳۸	۰/۰۰۴۵
	۹۱/۱۸	۲۲/۴۴	۱۶/۵۱	<۰/۰۰۱۲



شکل ۱- مقایسه میزان آنتوسیانین پیش بینی شده در مدل و مقادیر واقعی به دست آمده در روش استخراج سنتی با حلال

آنتوسیانینی طبیعی دارای pH پایین می‌باشند که موجب ثبات آنتوسیانین موجود در بافت گیاهی و نیز رنگ قرمز آنها می‌شود. pH عصاره به دست آمده (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در نسبت حلال ۲۰ میلی‌لیتر بر گرم از ۴/۰۲ تا ۵/۲۰ و در نسبت حلال ۸۰ میلی‌لیتر بر گرم از ۲/۰۷ تا ۳/۲۸، تغییر کرد (جدول ۲). pH عصاره همچنین در نسبت یکسان حلال با افزایش درجه حرارت، زمان و درصد اتانول افزایش یافت. آنتوسیانین‌ها در pH بالا از پایداری کمتری برخوردارند (Giusti & Wrolstad, 2001). بنابراین استفاده از نسبت‌های کمتر حلال و بالا رفتن pH عصاره می‌تواند به عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر در تخریب آنتوسیانین و کاهش کل آنتوسیانین استخراج مطرح باشد. علاوه بر این همان طور که پیش از این ذکر شد افزایش غلظت ترکیبات مؤثر عصاره در نسبت‌های پایین‌تر حلال به واسطه احتمال برخورد و در نتیجه واکنش بیشتر بین آنتوسیانین‌های منومری با یکدیگر و نیز با دیگر ترکیبات موجب کاهش پایداری و نیمه‌عمر کوتاه‌تر می‌شود.

در بررسی اثر نسبت حجم حلال و دما در زمان ۱۶ ساعت و اتانول ۵۰ درصد (شکل ۳)، حداکثر رنگدانه استخراج شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در حجم حلال ۸۰ میلی‌لیتر بر گرم به دست آمد. نسبت بالاتر حلال موجب ایجاد اختلاف غلظت بیشتر، افزایش ضریب انتشار و در نتیجه خروج سریع‌تر آنتوسیانین از بافت گلبرگ و افزایش میزان استخراج شد. در نسبت حلال بیش از حدود ۵۰ میلی‌لیتر بر گرم با افزایش نسبت حلال به حل‌شونده، به دلیل کم شدن نسبت وزن گلبرگ در حجم حلال و کاهش غلظت آنتوسیانین استخراج شده، از میزان آنتوسیانین عصاره کاسته شد و با افزایش دما کاهش آنتوسیانین سرعت گرفته تا جایی که در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد افزایش نسبت، تأثیری بر میزان استخراج نداشت. از طرف دیگر افزایش دما بدون در نظر گرفتن نسبت حلال، موجب کم شدن میزان آنتوسیانین عصاره شد. در بررسی اثر نسبت حلال بر راندمان استخراج گلبرگ گل زعفران نمی‌توان اثر تغییرات pH عصاره به دست آمده را نادیده گرفت؛ اکثر منابع



شکل ۳- نمودار سطح پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر دما- نسبت حلال پس از زمان ۱۶ ساعت و ۵۰ درصد اتانول

(۲۰۰۳a) بر روی استخراج آنتوسیانین موجود در کشمش سیاه صورت گرفت؛ به بررسی اثر درصد اتانول موجود در حلال در دمای استخراج (زمان استخراج ۱۵۰ دقیقه) پرداخته و مشاهده کردند که با افزایش درصد اتانول حلال (از ۲۰ به ۸۵ درصد) دمای بحرانی آنتوسیانین که در آن آنتوسیانین شروع به تخریب می‌کند؛ از ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ۳۵ درجه

اثر متقابل متغیرهای دما و درصد اتانول بر میزان استخراج (هر چند با ضریب اطمینان ۹۵ درصد معنادار نبود)، در شکل ۴ نشان داده شده است. همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود به طور کلی افزایش درصد اتانول و دما، میزان آنتوسیانین عصاره را در بازه زمانی ۱۶ ساعت بطور پیوسته کاهش داد. در پژوهش مشابهی که توسط Mazza و Cacace



در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در نسبت ثابت حلال ۵۰ میلی‌لیتر بر گرم را نشان می‌دهد. مطابق شکل میزان آنتوسیانین استخراج شده تابعی از هر دو متغیر درصد اتانول و زمان استخراج بوده است. در زمان‌های کمتر از ۱۲ ساعت جهت استخراج، همزمان با افزایش درصد اتانول حلال، میزان استخراج افزایش و در زمان‌های بیش از ۱۲ ساعت در روندی بر عکس با افزایش میزان اتانول حلال، آنتوسیانین منومری استخراج شده کاهش یافت. به طوری که در استخراج ۲۴ ساعته، حلال با ۲۵ درصد اتانول بیشترین آنتوسیانین منومری استخراج شده را نشان داد. در این نمودار نیز مشاهده می‌شود که به طور کلی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، در غلظت‌های بیش از ۵۰ درصد اتانول، روند کاهشی آنتوسیانین کل نسبت به زمان، از سرعت بالاتری نسبت به همین روند در غلظت‌های پایین‌تر اتانول، برخوردار بوده است.

#### بهینه‌سازی شرایط استخراج

شرایط بهینه جهت استخراج آنتوسیانین از عصاره گلبرگ زعفران به منظور دستیابی به بیشترین میزان آنتوسیانین، مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۴). جهت تعیین حدود متغیرها، مصرف کمتر حلال و نیز درصد پایین اتانول مد نظر قرار گرفتند. حد پایین آنتوسیانین برابر ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد و برابر میزان آنتوسیانینی بود که حدود ۶۰ درصد میانگین داده‌های حاصل از استخراج در این پژوهش، بالاتر از آن بودند و حد بالای آن برابر ۱۶۸۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد و برابر میزان آنتوسیانین حاصل از دو بار استخراج نمونه در نقطه‌ی مرکزی<sup>۳</sup> متغیرها (زمان ۱۶ ساعت، ۳۵ درجه سانتی‌گراد، اتانول ۵۰ درصد و نسبت حلال ۵۰ میلی‌لیتر بر گرم) بود. از بین راه‌حل‌های ارائه‌شده توسط نرم‌افزار با در نظر گرفتن مطلوبیت<sup>۴</sup> بالا، شرایط بهینه‌ی استخراج، انتخاب شد که عبارت بودند از: زمان استخراج ۲۴ ساعت، دمای ۲۵/۸ درجه سانتی‌گراد، نسبت حلال ۲۰ میلی‌لیتر بر گرم و اتانول ۲۵/۰۲ درصد (جدول ۴)؛ که در این شرایط مقدار آنتوسیانین استحصالی مورد پیش‌بینی

سانتی‌گراد افزایش می‌یابد و در هر دما با افزایش درصد اتانول تا ۶۰ درصد راندمان ابتدا افزایش و سپس کاهش نشان داد. در صورتی که تغییرات درصد اتانول بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عصاره تأثیری نداشت و در کار دیگری که از این دو محقق بر روی بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولی از دانه‌های توت<sup>۱</sup> صورت گرفت در زمان استخراج ۱۵۰ دقیقه بیشترین ترکیبات فنولی بدون در نظر گرفتن دما در غلظت ۶۰ درصد اتانول استخراج شد و در غلظت‌های بالاتر یا پایین‌تر، میزان استخراج کاهش یافت اختلاف نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با پژوهش‌های مذکور می‌تواند مربوط به اختلاف زمان استخراج (۱۶ ساعت) و اثر تخریبی دما در بازه زمانی مذکور بر آنتوسیانین‌ها باشد (Cacace & Mazza, 2003b).

در بررسی اثر دو متغیر زمان-نسبت حلال (شکل ۵) بر آنتوسیانین منومری استخراج شده ملاحظه شد که بالاترین راندمان استخراج در حداقل زمان، با حداکثر نسبت حلال به‌دست آمده است که به‌واسطه‌ی اثر مستقیم حلال در طی زمان، بر روی استخراج ترکیبات مؤثره در فرایند استخراج سنتی با حلال می‌باشد و به‌طور کلی بیشترین تغییرات آنتوسیانین استخراج شده نسبت به تغییر نسبت حلال در زمان‌های تا ۱۲ ساعت استخراج دیده شد. به این معنا که در زمان کوتاه‌تر استخراج، با کم‌رنگ شدن اثر متغیر زمان بر استخراج، اثر مستقیم نسبت حلال بر میزان آنتوسیانین استخراج شده نمایان‌تر بود (Cacace & Mazza, 2003b). پیش از این در بهینه‌سازی استخراج آنتوسیانین و دیگر ترکیبات فنولی از عصاره‌ی کشمش سیاه<sup>۲</sup>، مشاهده کردند که با افزایش نسبت حلال اتانول، به ماده حل شونده، میزان استخراج افزایش یافته و زمان رسیدن به غلظت تعادلی کاهش یافته است. این پژوهشگران نتایج مشابهی نیز در استخراج ترکیبات فنولی از توت به‌دست آورده‌اند (Cacace & Mazza, 2003a).

شکل ۶ نمودار سطح پاسخ اثر تغییرات زمان-درصد اتانول را بر میزان آنتوسیانین کل استخراج شده

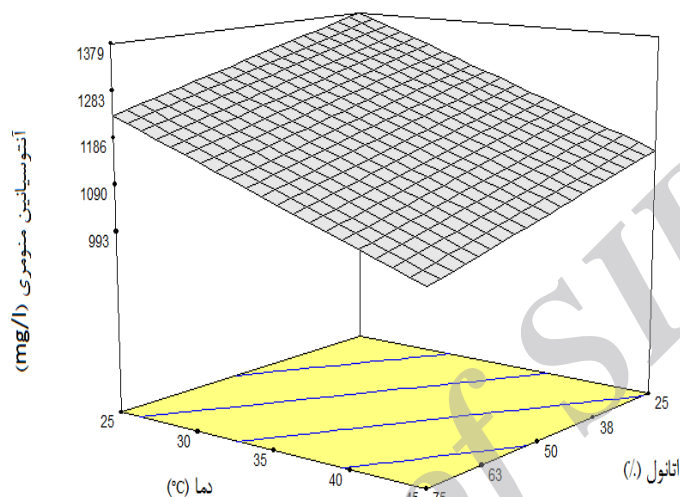
3- Central point  
4- Desirability

1- Milled berries  
2- Black currant

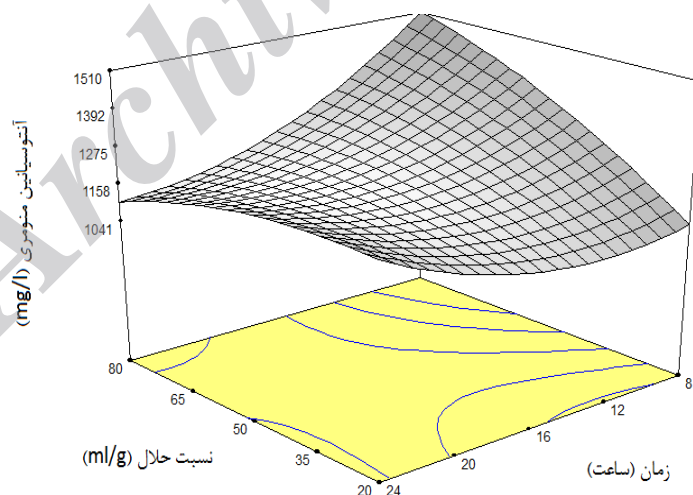
بر گرم و اتانول ۲۵ درصد) صورت گرفت. میانگین میزان آنتوسیانین به دست آمده از ۳ تکرار، برابر  $1542/14 \pm 67$  میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد که با در نظر گرفتن انحراف معیار به مقدار پیش‌بینی شده در مدل نزدیک بوده و بیانگر برازش مناسب مدل پیش‌بینی شده می‌باشد.

مدل برابر  $1609/11$  میلی‌گرم بر لیتر عصاره به دست آمد.

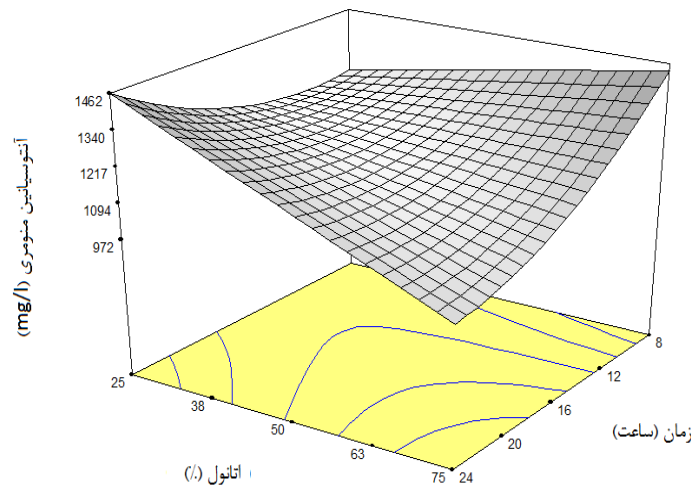
در ادامه جهت بررسی میزان انطباق شرایط بهینه‌ی استخراج در مدل با آزمون‌ها در شرایط آزمایشگاه، شرایط استخراج با حلال مطابق شرایط بهینه استخراج (زمان استخراج ۲۴ ساعت، دمای  $26 \pm 0/5$  درجه سانتی‌گراد، نسبت حلال ۲۰ میلی‌لیتر



شکل ۴- نمودار سطح پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر درصد اتانول - دما در زمان ۱۶ ساعت و نسبت حلال ۵۰ میلی‌لیتر بر گرم نمونه



شکل ۵- نمودار سطح پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر زمان - نسبت حلال در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و درصد اتانول ۵۰ درصد



شکل ۶- نمودار سطح پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر زمان-درصد اتانول در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال ۵۵ میلی‌لیتر بر گرم نمونه

جدول ۴- پیش‌بینی شرایط بهینه دستیابی به بالاترین راندمان استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران

ملاک‌های بهینه‌سازی	حد پایین	حد بالا	بهینه
نسبت حلال به نمونه (میلی‌لیتر بر گرم)	۲۰	۵۰	۲۰
اتانول (درصد)	۲۵	۷۵	۲۵/۰۲
دما (درجه سانتیگراد)	۲۵	۴۵	۲۵/۸
زمان (ساعت)	۸	۲۴	۲۴
میزان آنتوسیانین (میلی‌گرم بر لیتر)	۱۲۰۰	۱۶۸۰	۱۶۰۹/۱۱

### نتیجه‌گیری

افزایش و در زمان‌های بیش از ۱۲ ساعت در روندی برعکس با افزایش میزان اتانول حلال، کاهش یافت. بیشینه آنتوسیانین منومری طی استخراج با مصرف حداقل حلال و کمترین درصد اتانول در حلال در زمان استخراج ۲۴ ساعت، دمای ۲۵/۸ درجه سانتی‌گراد، نسبت حلال ۲۰ میلی‌لیتر بر گرم و اتانول ۲۵/۰۲ درصد و مقدار آنتوسیانین منومری استخراج شده برابر ۱۶۰۹/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. مقدار آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ زعفران بالا بوده و می‌توان گلبرگ زعفران را به عنوان جایگزینی بالقوه جهت تولید رنگ طبیعی آنتوسیانین در صنایع غذایی و دارویی معرفی کرد که در این زمینه همچنان جای پژوهش و بررسی بیشتر وجود دارد.

متغیرهای فرایند شامل دما، زمان، نسبت حلال و درصد اتانول به لحاظ آماری دارای اثر مستقل معنادار بر استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران بودند. از مدل درجه دوم کاسته شده جهت پیش‌بینی میزان استخراج آنتوسیانین استفاده شد. افزایش دما بدون در نظر گرفتن اثر متغیرهای دیگر، همواره موجب کاهش میزان آنتوسیانین استخراج شده شد در مقابل افزایش نسبت حلال از طرفی موجب افزایش اختلاف غلظت آنتوسیانین و افزایش استخراج آنتوسیانین و از طرف دیگر به دلیل کاهش pH عصاره حاصل، موجب افزایش پایداری آنتوسیانین استخراج شده گردید. میزان آنتوسیانین استخراج شده تا حدود ۱۲ ساعت زمان استخراج، همزمان با افزایش درصد اتانول حلال،

### منابع

۱- مقصودی، ش. ۱۳۸۹، زعفران (کشاورزی، صنعت، تغذیه، درمان)، علم کشاورزی ایران، تهران، صفحه ۱۷۸.

- ۲- همتی، ع، حسینی، ک. د، رحیمی، س. ک. ۱۳۷۳، جستجو و استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران خراسان و بررسی پایداری آن در یک نوشابه مدل، طرح پژوهشی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد.
- 3- Agha-Hosseini, M., Kashani, L., Aleyaseen, A., Ghoreishi, A., Rahmanpour, H., Zarrinara, A. R., & Akhondzadeh, S. 2008. *Crocus sativus* L. (saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo-controlled trial. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115 (4): 515-519.
  - 4- Akhondzadeh Basti, A., Moshiri, E., Noorbala, A.-A., Jamshidi, A.-H., Abbasi, S. H., & Akhondzadeh, S. 2007. Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: A pilot double-blind randomized trial. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31 (2): 439-442.
  - 5- Andersen, M., Jordheim, M., 2010. Chemistry of Flavonoid-Based Colors in Plants, *Comprehensive Natural Products II: 547-614.*, University of Bergen, Bergen, Norway.
  - 6- Atokaran, M. 2011. *Natural food flavor and colors 464: willy & Sons, New York.*
  - 7- Barzana, E., Rubio, D., Santamaria, R. I., Garcia-Correa, O., Garcia, F., Ridaura Sanz, V. E., & Liopez-Munguina, A. 2002. Enzyme-Mediated Solvent Extraction of Carotenoids from Marigold Flower (*Tagetes erecta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (16): 4491-4496.
  - 8- Bridle, P., & Timberlake, C. F. 1997. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chemistry*, 58 (1-2): 103-109.
  - 9- Cacace, J. E., & Mazza, G. 2003a. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59 (4): 379-389.
  - 10- Cacace, J. E., & Mazza, G. 2003b. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of Food Science*, 68 (1): 240-248.
  - 11- Castaoveda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. d. L., Priez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A., & Galoan-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113 (4): 859-871.
  - 12- Fatehi, M., Rashidabady, T., & Fatehi-Hassanabad, Z. 2003. Effects of *Crocus sativus* petal's extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, 84 (2): 199-203.
  - 13- Fuleki, T., & Francis, F. J. 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 33 (1): 78-83.
  - 14- Garrido, J., Diez de Bethencourt, C., & Revilla, E. 1987. Flavonoid composition of hydrolysed tepal extracts of *Crocus sativus* L. *Anal. Bromatol, Madrid, Spain*, 39:69-77
  - 15- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, New York.*
  - 16- Gould, K., Davies, K., & Winefield, C. 2008. *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications, Springer, New York.*
  - 17- Hadizadeh, F., Khalili, N., Hosseinzadeh, H., & Khair-Aldine, R. 2003. Kaempferol from saffron petals. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 251-252.
  - 18- 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

- 19- Hosseinzadeh, H., & Ghenaati, J. 2006. Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia*, 77 (6): 446-448.
- 20- Hosseinzadeh, H., Motamedshariaty, V., & Hadizadeh, F. 2007. Antidepressant effect of kaempferol, a constituent of saffron (*Crocus sativus*) petal, in mice and rats: *Pharmacologyonline*, 2: 367-370.
- 21- Kafi, M. 2006. Saffron (*Crocus sativus*) Production and Processing: Science Publishers, New York.
- 22- 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.
- 23- Koocheki, A., Taherian, A. R., Razavi, S. M. A., & Bostan, A. 2009. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids*, 23 (8): 2369-2379.
- 24- Kubo, I., & Kinst-Hori, I. 1999. Flavonols from Saffron Flower: Tyrosinase Inhibitory Activity and Inhibition Mechanisms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (10): 4121-4125.
- 25- Lee, J., Rennaker, C., & Wrolstad, R. E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 110 (3): 782-786.
- 26- Moshiri, E., Basti, A. A., Noorbala, A.-A., Jamshidi, A.-H., Hesameddin Abbasi, S., & Akhondzadeh, S. 2006. *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytomedicine*, 13 (10): 607-611.
- 27- Norbark, R., Brandt, K., Nielsen, J. K., girgaard, M., & Jacobsen, N. 2002. Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30 (8): 763-791.
- 28- Pala, K. U., & Toklucu, A. K., 2011. Effect of UV-C light on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 :790-795.
- 29- Patras, A., Brunton N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (1): 3-11.
- 30- Serrano-Diaz, J. S., Scinchez, A. M., Maggi, L., Carmona, M., & Alonso, G. L., 2011. Synergic effect of water-soluble components on the coloring strength of saffron spice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (6): 873-879.
- 31- Stintzing, F. C., & Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (1): 19-38.
- 32- Van Sumere, C., Vande Castele, 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.
- 33- Williams, C. A., Harborne, J. B., & Goldblatt, P. 1986. Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family iridaceae. *Phytochemistry*, 25(9): 2135-2154.
- 34- Yoshida, K., Kondo, T., & Goto, T. 1991. Unusually stable monoacylated anthocyanin from purple yam (*Dioscorea alata*). *Tetrahedron letters*, 32 (40): 5579-5580.

## Optimization of anthocyanin extraction in Saffron's petal with response surface methodology

Katayon Mahdavee Khazaei<sup>1</sup>, Seyed Mehdi Jafari<sup>2\*</sup>, Mohammad Ghorbani<sup>3</sup>,  
Abbas Hemmati Kakhki<sup>4</sup>

1- MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

\* Corresponding author (smjafari@gau.ac.ir)

3- Associated Professor, Department of Food Science and Technology, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Sciences and Technology, Mashhad, Iran

### Abstract

In this study, optimum conditions of anthocyanins (Acys) extraction from petals of saffron flower (*Crocus sativus*) were determined by acidified ethanol solvent. The independent factors were solvent to sample ratio (20- 80 ml/g), percent of ethanol (25 -75%), temperature (25-45°C) and extraction time (8-24h). Response surface methodology (RSM) was used to determine optimum conditions of extraction of anthocyanins with the highest extraction rate of cyanidin-3-glucoside. The experiments were designed according to Box Behnken Design with four independent factors. Obtained coefficients of variance showed that the effect of temperature was more markedly than others ( $p < 0.05$ ). Optimum extraction conditions were a ratio of 20 ml solvent/g sample, ethanol percent 25.02 %, temperature 25.8°C and extraction time 24h. Under these optimum conditions, 1609 11mg/l Acys was produced. A quadratic reduced second-order regression equation described the effects of independent process variables on extraction Acys from Saffron flower.

**Keywords:** Anthocyanins, Extraction, Response surface methodology, Saffron flower' petal