

بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات زیست فعال از گلبرگ زعفران به روش سطح پاسخ

زهرا احمدیان کوچکسرای^{۱*}، راضیه نیازمند^۲، مسعود نجف نجفی^۳

۱- دانشجوی دکتری گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
* نویسنده مسئول (ahmadian.zr@gmail.com)

۲- استادیار گروه شیمی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

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

چکیده

گیاه زعفران از جمله گیاهانی است که از دیرباز در مصارف خوراکی و طب سنتی استفاده می‌شده و یکی از منابع ارزشمند آنتی‌اکسیدانی به شمار می‌رود. اما همچنان اطلاعات کمی در مورد نحوه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از بخش‌های مختلف این گیاه، خصوصاً گلبرگ آن موجود است. استخراج به کمک حلال آلی یکی از مهم‌ترین روش‌های استحصال ترکیبات ارزشمند از منابع گیاهی است و در مقیاس صنعتی و آزمایشگاهی قابل اجرا می‌باشد. در این پژوهش از روش سطح پاسخ-طرح باکس‌بنکن به منظور بررسی تأثیر زمان استخراج (۶۰-۲۰ دقیقه)، دمای استخراج (۸۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد) و درصد اتانول حلال (۶۰-۲۰ درصد) بر راندمان استخراج ترکیبات پلی‌فنولی، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و نیز بهینه‌سازی فرایند استخراج استفاده گردید. نتایج نشان داد، در صورتی که زمان استخراج ۱۰۴/۲۹ دقیقه، دمای استخراج ۶۶/۳۱ درجه سانتی‌گراد و درصد اتانول ۵۸/۹۶ باشد، بیشترین بازده استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌گردد. تحت این شرایط میزان ترکیبات پلی‌فنولی، ۱۱۳۴ (میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک)؛ فلاونوئید، ۸۵/۴۴ (میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک)؛ آنتوسیانین، ۳۵۸۴/۱۳ (میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک)؛ درصد به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، ۶۰/۶۰ درصد و توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن، ۳/۲۴ میلی‌مولار به دست آمد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۲۴

واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین

آنتی‌اکسیدان

پلی فنول

روش سطح پاسخ

گلبرگ زعفران

مقدمه

و خصوصیات فیزیولوژیکی از جمله ضدالتهاب^۱، ضد آلرژی^۲، ضد میکروبی^۳، آنتی‌اکسیدانی^۴ و غیره می‌باشند (Rodrigues et al., 2008). افزودن

طی سال‌های اخیر توجه به یافتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی که بتواند جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مورد استفاده در غذاها شود، معطوف شده است (Kaur et al., 2006). ترکیبات فنولیک موجود در برخی گیاهان دارای فواید

¹ Anti-inflammatory

² Anti-allergic

³ Anti-microbial

⁴ Anti-oxidant

وجود دارد. در مطالعات گوناگون خواص آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضدالتهابی (Hosseinzadeh & Basti *et al.*, 2002)، اثر ضدافسردگی (Younesi, 2007) و اثر بر فشارخون (Fatehi *et al.*, 2003) عصاره گلبرگ زعفران مورد بررسی قرار گرفته است. گلبرگ زعفران حاوی آنتی‌اکسیدان قوی فلاونوئیدها می‌باشد که به صورت متصل به آلبومین، در سرم خون حمل می‌گردد و با این پروتئین اثرات متقابل دارد. از طرف دیگر تأثیرات متفاوت فلاونوئیدها در کاهش کلسترول (Nijveldt *et al.*, 2001) و خواص ضد رادیکالی (Catoni *et al.*, 2008) آن بارها به اثبات رسیده است.

در رابطه با ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران پژوهش‌های اندکی صورت گرفته است. در پژوهشی خواص آنتی‌اکسیدانی پیاز، گلبرگ و برگ‌های زعفران مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل از پژوهش نشان داد، گلبرگ‌ها و برگ‌های گیاه زعفران می‌توانند به عنوان منابع آنتی‌اکسیدانی قابل استخراج، مورد استفاده قرار گیرند (Sánchez-Vioque *et al.*, 2012). در پژوهش دیگری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات عصاره گلبرگ زعفران با استفاده از روش ^{+}ESI -DAD-MS^{LC} ارزیابی گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد علاوه بر کلاله زعفران، از گلبرگ‌های گیاه زعفران نیز می‌توان جهت استخراج ترکیبات فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود. (Termentzi & Kokkalou, 2008). مطالعات پیشین، به‌کارگیری گل‌های زعفران را در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی به سبب داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و پزشکی توصیه نمودند (Ulbricht *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011).

اهمیت آنتی‌اکسیدان‌ها از جنبه سلامتی و صنایع غذایی باعث شده تا روش‌هایی برای استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها در نظر گرفته شود که بیشترین بازده استخراج و کیفیت (فعالیت آنتی‌اکسیدانی) را داشته باشند. یکی از روش‌های رایج بازیافت آنتی‌اکسیدان‌ها، روش استخراج با حلال است که بازده استخراج و

آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)^۱، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)^۲، ترسیو بوتیل هیدروکینون (TBHQ)^۳ می‌تواند اکسیداسیون لیپیدها را در مواد غذایی کنترل کند، و لیکن استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل سمیت و خطراتی که برای سلامتی دارند، محدود شده است. از این رو تلاش جهت یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی خصوصاً با منشأ گیاهی افزایش یافته است. در سال‌های اخیر استفاده از محصولات جانبی صنایع غذایی مانند پوست و دانه انگور، پوست و پالپ مرکبات، تفاله سیب و انار، ضایعات پوست سیب‌زمینی، ضایعات پیاز و گلبرگ زعفران مورد توجه قرار گرفته است (Weisburger, 1999).

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. متعلق به خانواده زنبقی‌ها (Iridaceae) گیاهی علفی و چند ساله است که به طور وسیعی در مناطق مختلفی از جهان خصوصاً ایران کشت می‌شود. از گل‌های این گیاه، کلاله‌های خشک به دست می‌آید که به عنوان گران‌بهارترین ادویه جهان شناخته می‌شود (Esmaili *et al.*, 2011). ایران بزرگ‌ترین تولید کننده زعفران است و بالغ بر ۹۰ درصد زعفران دنیا در ایران تولید می‌شود. استان خراسان بزرگ به ویژه خراسان جنوبی و خراسان رضوی مناطق عمده کشت زعفران را تشکیل می‌دهند. بر اساس آمار، در سال زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹، ۳۰۰ تن زعفران بر اساس وزن خشک تولید شده است. از هر ۷۸ کیلو گرم گل به طور معمول ۱ کیلو زعفران دسته‌ای (کلاله همراه با خامه) حاصل می‌شود. از این رو، سالانه حدود ۳۸۴۶ کیلوگرم کلاله و ۲۹۶۱۵۴ کیلوگرم گلبرگ زعفران بر اساس وزن خشک به عنوان محصول جانبی تولید شده که به دلیل غیر قابل استفاده بودن آن تاکنون، دور ریخته می‌شده است (Kazuma *et al.*, 2003). زعفران در طب سنتی دارای خواص دارویی بی‌شمار است که عمده تحقیقات دارویی روی کلاله زعفران انجام شده است. علاوه بر این شواهد گوناگونی مبنی بر وجود ترکیباتی با اثرات دارویی مختلف در گلبرگ زعفران

¹ Butylated Hydroxyanisole

² Butylated Hydroxytoluene

³ *tert*-Butylhydroquinone

⁴ liquid chromatography-diode-array detection-mass spectrometry (electron-spray ionization)

شرایط هر آزمون شامل دما (۲۵، ۵۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۶۰، ۱۳۰ و ۲۰۰ دقیقه) و درصد اتانول در حلال (۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد) بر اساس سطوح متغیرهای پیش‌بینی شده در طرح باکس‌بنکن^۴ مطابق جدول ۱ در نظر گرفته شد. در نهایت پس از گذشت زمان استخراج، عصاره از صاف کردن نمونه با کاغذ صافی واتمن (شماره ۱) و به کمک خلأ به دست آمد. عصاره‌های بدست‌آمده در بطری‌های شیشه‌ای در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون نگهداری گردید.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی

محتوای فنولی کل بر اساس روش فولین-سیوکالچو تعیین گردید (McDonald et al., 2001). ابتدا ۴۰ میکرو لیتر از عصاره با ۳/۱۶ میلی‌لیتر از آب دیونیزه و ۲۰۰ میکرو لیتر از معرف فولین-سیوکالچو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس ۶۰۰ میکرو لیتر کربنات سدیم ۲۵ درصد به مخلوط اضافه و در نهایت پس از ۹۰ دقیقه ماندن در دمای اتاق، جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (دو پرتویی فرابنفش-مرئی Shimatzo، مدل UV-160A، ساخت ژاپن) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش از اسید گالیک (۹۵۰ ppm-۱۰۰) به عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم شده و میزان ترکیبات فنولی کل موجود در نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین شد. نتایج نیز بر اساس میلی‌گرم اسیدگالیک / صد گرم گلبرگ خشک گزارش گردید.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدی

سنجش فلاونوئیدها بر اساس آزمون رنگ‌سنجی صورت گرفت (Zhishen et al., 1999). بدین ترتیب که ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر آب و ۱۵۰ میکرو لیتر از محلول ۵٪ نیتريت سدیم (NaNO₂) مخلوط و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول ۱۰٪ کلرید آلومینیوم (AlCl₃.6H₂O) به مخلوط اضافه و پس از ۵ دقیقه ماندن، ۱ میلی‌لیتر از محلول

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده به میزان زیادی به حلال مورد استفاده، دما، زمان، نسبت حلال به نمونه بستگی دارد.

از آنجا که مطالعات اندکی روی استخراج ترکیبات فنولی از گلبرگ زعفران صورت گرفته است، این پژوهش با هدف بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره آنتی‌اکسیدانی از گلبرگ زعفران به عنوان یک منبع ارزان قیمت با استفاده از روش سطح پاسخ، طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد

گلبرگ‌های زعفران از مزرعه‌ای در منطقه تربت‌حیدریه استان خراسان رضوی تأمین گردید. گلبرگ‌ها به منظور خشک شدن در سالی تاریک در دمای محیط قرار داده شده و تا خشک شدن کامل چند مرحله زیر و رو شدند. سپس، گلبرگ‌های خشک شده (رطوبت ۳/۵ درصد) توسط آسیاب خانگی پودر و اندازه ذرات آن با استفاده از الک با مش ۵۰ میکرومتر تنظیم و تا زمان انجام آزمون‌ها در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سایر مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل اتانول ۹۶٪، معرف فولین-سیوکالچو^۱، اسیدگالیک، کربنات‌سدیم، استات‌سدیم، کلریدپتاسم، نیتريت‌سدیم، کلرید-آلومینیوم، هیدروکسیدسدیم از شرکت مرک آلمان و ۱و۱ دی فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل^۲ (DPPH) و ۴و۲ و ۶و - تریس (۲-پیریدیل)-اس-تریازین^۳ (TPTZ) از شرکت سیگما خریداری گردید.

روش‌ها

استخراج با حلال آبی-الکلی

استخراج عصاره گلبرگ زعفران توسط خیساندن در حلال آبی-اتانولی صورت گرفت. بدین منظور مقدار مشخصی از پودر گلبرگ با حلال مخلوط (نسبت گلبرگ به حلال: ۱ به ۳۰ وزنی/حجمی) و جهت استخراج بهتر بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد.

^۱ Folin-Ciocalteu reagent

^۲ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

^۳ 2,4,6-tripyridyltriazine

^۴ Box-Behnken

میلی مولار DPPH تهیه گردید. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره (غلظت ۹۰ میلی گرم/لیتر فنول) با ۳ میلی لیتر از محلول DPPH مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه ماندن در تاریکی، جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین گردید. درصد رادیکال آزاد DPPH مهار شده (%DPPH_{sc}) با استفاده از رابطه (۴) محاسبه گردید:

رابطه (۴)

$$\%DPPH_{sc} = (A_{cont} - A_{sample}) \times 100 / A_{cont}$$

A_{cont} مقدار جذب نمونه کنترل و A_{sample} مقدار جذب عصاره تعریف می شود.

آزمون FRAP^۱

آزمون قدرت آنتی اکسیدانی/کاهندگی آهن طبق روش Strain و Benzie (۱۹۹۶) با اندکی تغییرات انجام شد. واکنش گر FRAP از ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱۰ میلی مولار TPTZ، ۲/۵ میلی لیتر از محلول ۲۰ میلی مولار کلرید آهن و ۲۵ میلی لیتر از محلول ۳۰۰ میلی مولار استات بافر (pH ۳/۶) تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید. ۳ میلی لیتر از محلول تازه تهیه شده FRAP با ۱۵۰ میکرو لیتر از عصاره مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه ماندن در تاریکی، جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری شد. از محلول آبی سولفات آهن (II) (FeSO₄.7H₂O) جهت تهیه نمودار کالیبراسیون استفاده گردید.

طرح آماری و روش آنالیز نتایج

در این پژوهش به منظور مطالعه تأثیر فرآیند استخراج بر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از گلبرگ زعفران، از طرح باکس بنکن برای پارامترهای استخراج شامل دما و زمان استخراج و نیز درصد اتانول در حلال با حدود مشخص بالا و پایین استفاده شد. این طرح شامل سه متغیر مستقل در سه سطح و سه تکرار بود. سطوح متغیرهای مستقل و کدهای مربوطه در جدول ۱ و تیمارهای حاصل در جدول ۲ ذکر شده اند. برای طراحی آزمایش و آنالیز نتایج از نرم افزار دیزاین

سود ۱ مولار و ۵۵۰ میکرو لیتر آب به مخلوط اضافه گردید. در نهایت پس از حدود ۵ دقیقه ماندن، جذب آن در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. در این روش از کوئرستین (۸۰-۱۰ ppm) به عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج بر اساس میلی گرم کوئرستین / صد گرم گلبرگ خشک بیان گردید.

اندازه گیری آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین گلبرگ زعفران با استفاده از روش pH افتراقی سنجش گردید (Lee et al., 2005). بدین منظور رقیق سازی عصاره ها در بافرهای با pH ۱ و ۴/۵ و قرائت جذب آن در طول موج های ۵۱۷ و ۷۰۰ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

مقدار جذب عصاره (A) طبق رابطه ۱ و میزان آنتوسیانین مونومری طبق رابطه ۲ و ۳ محاسبه گردید:

رابطه (۱)

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700nm}})_{pH1.0} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700nm}})_{pH4.5}$$

رابطه (۲)

$$\text{محتوای آنتوسیانین (میلی گرم/لیتر)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times L)$$

رابطه (۳)

$$= \text{بازده (میلی گرم/۱۰۰ گرم گلبرگ خشک)}$$

$$(v \times \text{محتوای آنتوسیانین}) \times 100 / (m)$$

در رابطه های بالا A مقدار جذب نمونه، A_{λ_{vis-max}} بیشترین جذب بدست آمده، MW وزن مولکولی سیانیدین تری گلیکوزید (گرم بر مول)، DF فاکتور رقت، ε ۲۶۹۰۰ برابر جذب مولی سیانیدین تری گلیکوزید، L قطر سل اسپکتروفتومتر برحسب سانتی متر و ۱۰۰۰ به منظور تبدیل گرم به میلی گرم، v (لیتر) حجم عصاره استخراج شده و m (گرم) وزن گلبرگ خشک می باشد.

اندازه گیری قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH نمونه ها طبق روش von Gadow و همکاران (۱۹۹۷) تعیین شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول اتانولی ۰/۱

¹ Ferric Reducing Power

اکسپرت^۱ (نسخه ۷) استفاده گردید.

ضرایب تعیین شدند. تأیید کارایی بهترین فرمول ارائه شده توسط مدل نیز از طریق مقایسه نتایج حاصل از تولید آن با نتایج پیشگویی شده توسط مدل مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل و کدهای مربوطه.

متغیر مستقل	نماد	کد و سطح مربوطه		
		-۱	۰	+۱
زمان (دقیقه)	A	۶۰	۱۳۰	۲۰۰
دما (درجه سانتی‌گراد)	B	۲۵	۵۵	۸۵
درصد اتانول در حلال	C	۲۰	۴۰	۶۰

نتایج و بحث

تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنولی

در جدول ۳، نتایج تجزیه واریانس ترکیبات عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران ملاحظه می‌گردد. عبارتهای معنی‌دار شامل زمان، دما، درصد اتانول حلال و نیز مجذور دما و زمان بودند. به منظور به دست آوردن مدل تجربی برای پیش‌بینی پاسخ، رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم بر داده‌های بدست‌آمده از آزمایش برآزش شدند. لذا عبارات بی‌معنی از رابطه پیشگو حذف شدند و در نتیجه، روند تغییر ترکیبات فنولی استخراج شده با توجه به مؤلفه‌های استخراج و به صورت نمودار روبه پاسخ در شکل ۱ و رابطه حاصل در جدول ۳، مشاهده می‌گردد. بررسی رابطه بدست‌آمده برای ترکیبات فنولی استخراج شده نشان می‌دهد که رابطه حاصل، از R^2 و R^2 (adj) متناسب، بالا و بسیار معنی‌داری ($P \leq 0.001$) برای پیشگویی آن برخوردار است. آزمون ضعف برآزش آن بی‌معنی ($P > 0.05$) و ضریب تغییرات آن نیز پایین (۱/۳۹) می‌باشد که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است.

بررسی جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که زمان استخراج در مقایسه با سایر پارامترهای استخراج، تأثیر بیشتری بر مقدار استخراج پلی‌فنول دارد. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که زمان، دمای استخراج و نیز درصد اتانول حلال موجب افزایش معنی‌دار راندمان استخراج تیمارها شده‌اند. همچنین با در نظر گرفتن معنی‌داری عبارت درجه دوم پارامتر زمان مشخص می‌گردد که با افزایش زمان استخراج تا دقیقه ۱۱۰، میزان استخراج پلی‌فنول‌های گلبرگ زعفران افزایش و پس از آن،

جدول ۲- تیمارهای تصادفی آزمایش در طرح باکس بنکن

تیمار	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	درصد اتانول
۱	۱۳۰	۸۵	۶۰
۲	۱۳۰	۸۵	۲۰
۳	۶۰	۵۵	۶۰
۴	۱۳۰	۲۵	۲۰
۵	۱۳۰	۲۵	۶۰
۶	۱۳۰	۵۵	۴۰
۷	۱۳۰	۵۵	۴۰
۸	۶۰	۸۵	۴۰
۹	۶۰	۲۵	۴۰
۱۰	۱۳۰	۵۵	۴۰
۱۱	۱۳۰	۵۵	۴۰
۱۲	۲۰۰	۵۵	۲۰
۱۳	۲۰۰	۸۵	۴۰
۱۴	۲۰۰	۲۵	۴۰
۱۵	۶۰	۵۵	۲۰
۱۶	۱۳۰	۵۵	۴۰
۱۷	۲۰۰	۵۵	۶۰

بدین منظور معادلات ریاضی درجه دوم کامل با استفاده از آنالیز رگرسیون گام به گام پس رونده^۲ بر روی متغیرهای وابسته برآزش شدند. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای وابسته در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل، نمودار سطوح^۳ آنها به وسیله این نرم‌افزار ترسیم شدند. به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برآزش داده شده، آزمون ضعف برآزش^۴، ضریب تغییرات^۵، مقادیر R^2 ، R^2 (adj) مدل و P

^۱ Design Expert

^۲ Backward multiple stepwise regression

^۳ Surface Plot

^۴ Lack of fit

^۵ Coefficient of Variation (CV)

^۶ R square

^۷ R square (adj)

^۸ P Value

بالاترین بازده استخراج ترکیبات فنولی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد گزارش گردید (Pompeu *et al.*, 2009).

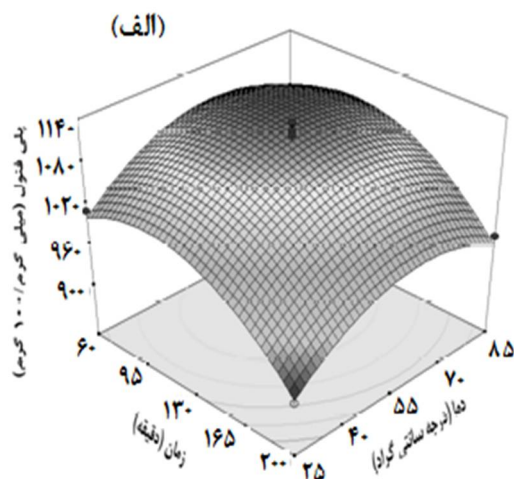
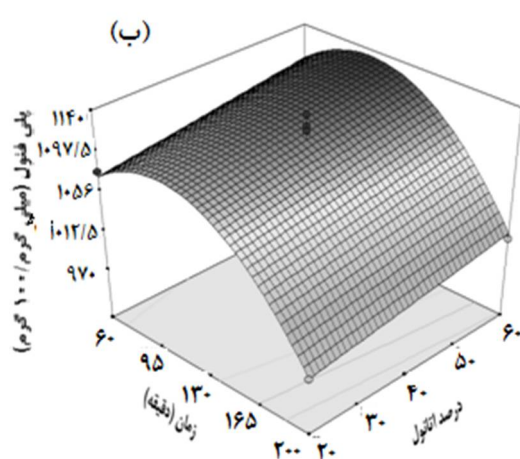
همان‌طور که در شکل ۱-ب مشخص است با افزایش درصد اتانول حلال، افزایش خطی میزان بازده استخراج پلی‌فنول‌ها مشاهده گردید. تأثیر درصد اتانول حلال بر استخراج پلی‌فنول‌ها توسط سایر محققان نیز گزارش گردیده است (Wissam *et al.*, 2012).

همچنین در پژوهشی که روی استخراج پلی‌فنول‌ها از توت سیاه صورت گرفت، محققین نتیجه مشابهی گزارش نمودند بدین ترتیب که با افزایش درصد اتانول تا ۶۰ درصد، بازده استخراج این ترکیبات افزایش یافت (Cacace & Mazza, 2003).

این رفتار به این علت است که افزایش میزان اتانول منجر به کاهش ثابت دی‌الکتریک محلول می‌گردد که باعث کاهش انرژی مورد نیاز برای جداسازی مولکول‌های حلال می‌شود. بدین ترتیب، مولکول‌های ماده حل‌شونده اجازه می‌یابند تا راحت‌تر بین آنها قرار گرفته و حل شوند (Pompeu *et al.*, 2009).

کاهش می‌یابد. در پژوهشی نیز که بر روی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از غلاف حبوبات صورت گرفت، محققان در زمان ۱۰۰ الی ۱۵۰ دقیقه بالاترین بازده استخراج و در زمان‌های طولانی‌تر، کاهش ترکیبات پلی‌فنولی را گزارش نمودند و آن را به تخریب ساختار با افزایش زمان نسبت داده و زمان کوتاه را برای استخراج، پیشنهاد نمودند (Gan & Latiff, 2011).

افزایش بازده استخراج با افزایش دما احتمالاً به دلیل بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت ترکیبات فنولی، افزایش ضریب نفوذ و کاهش ضریب ویسکوزیته حلال است؛ به‌علاوه افزایش دمای استخراج می‌تواند سبب کاهش کشش سطحی در منافذ گیاهی گردد (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Pompeu *et al.*, 2009; Wettasinghe & Shahidi, 1999). معنی‌داری عبارت درجه دوم پارامتر دما نشان می‌دهد که روند استخراج پلی‌فنول‌ها پس از رسیدن به حداکثر، در دمای حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد، با افزایش بیشتر دما کاهش خواهد یافت. این پدیده که در پژوهش‌های متعددی گزارش گردیده است، احتمالاً در اثر تخریب و اکسیداسیون برخی پلی‌فنول‌های حساس به حرارت در دماهای بالاتر می‌باشد (Silva *et al.*, 2007; Wissam *et al.*, 2012). در پژوهشی که بر روی میوه نوعی نخل صورت گرفت،



شکل ۱- اثر شرایط استخراج بر میزان پلی‌فنول عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف: اثر دما و زمان، ب: اثر درصد اتانول و زمان.

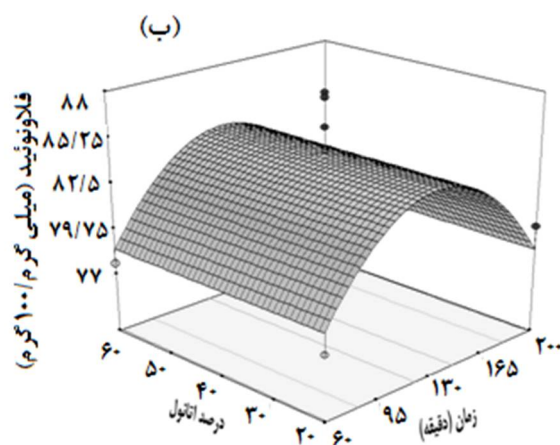
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس متغیرهای وابسته در استخراج عصاره گلبرگ زعفران

FRAP (میلی مولار)		DPPH		درصد مهارکنندگی		آنزوسیانین کل (میلی گرم/۱۰۰ گرم)		فلاونوئید کل (میلی گرم/۱۰۰ گرم)		پلی فنول کل (میلی گرم/۱۰۰ گرم)		درجه آزادی		منبع	
ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات
رابطه	مربعات	رابطه	مربعات	رابطه	مربعات	رابطه	مربعات	رابطه	مربعات	رابطه	مربعات	رابطه	مربعات	مربعات	مربعات
۰/۵۲۴***	۱/۶۱	۳۰/۸۷***	۱۹۹/۸۸	۲۸۶۹/۲۰***	۶۸۲۱۲۱/۸۲	۵۳/۱۹۵***	۳۵۰/۳۵	۶۷۶۷/۱۹***	۶۳۷۱۰/۵۸	۹	۶۳۷۱۰/۵۸			۹	میل
۰/۰۱۱***	۰/۴۱	۰/۱۲۴***	۴/۸۵۲	۴/۰۹۲***	۱۵۷۵۴/۶۲	ns	ns	۲/۹۵۵***	۱۸۵۲۸/۱۲	۱	۱۸۵۲۸/۱۲			۱	A (زمان)
۰/۰۴۳***	۰/۰۷۹	۰/۵۰۴*	۱۰/۵۷	۹/۷۶۹***	۱۵۵۱۰۸/۵۹	۰/۱۷۱***	۲۱۱/۲۱	۸/۲۹۲***	۵۵۶۵/۱۳	۱	۵۵۶۵/۱۳			۱	B (دما)
۰/۰۳۵***	۰/۱۶	۰/۳۷۵**	۲۱/۶۴	۶/۹۰۷***	۱۵۲۶۹۴/۴۸	ns	ns	۰/۸۱۲**	۲۱۱۲/۵۰	۱	۲۱۱۲/۵۰			۱	C (درصد اتانول)
۰/۰۶۶۴***	۰/۳۲	۰/۱۳۹***	۳/۸۱۱	ns	ns	-۱/۱۶۹***	۱۳۹/۱۴	-۰/۰۱۴***	۱۹۹۰۱/۶۴	۱	۱۹۹۰۱/۶۴			۱	A ²
۰/۲۶۳۶***	۰/۴۵	۰/۲۳۸***	۶۱/۲۶	ns	ns	ns	ns	-۰/۰۶۷***	۱۵۵۳۳/۸۱	۱	۱۵۵۳۳/۸۱			۱	B ²
۰/۳۵۴۵**	۰/۰۸۵	۰/۳۶۲*	۹/۰۴	ns	ns	ns	ns	ns	ns	۱	ns			۱	C ²
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	۱	ns			۱	AB
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	۱	ns			۱	AC
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	۱	ns			۱	BC
ns	۰/۰۷۹	ns	۱۳/۵۲	ns	۱۱۲۶/۳۸	ns	۵۳/۰۵	ns	۱۰۵۷/۱۴	۳	۱۰۵۷/۱۴			۳	ضعف برازش
۰/۰۸۹	۰/۰۸۹	ns	۱۵/۲۹	ns	۱۳۸۴۵/۴۱	ns	۶۹/۱۱	ns	۲۳۳۹/۰۷	۷	۲۳۳۹/۰۷			۷	خطای باقیمانده
۱/۷۰	۱/۷۰	۲/۲۱	۲۱۵/۱۶	۰/۹۹	۶۹۵۹۶۷/۲۳	۲/۷۲	۴۱۹/۴۷	۱/۳۹	۶۶۰۴۹/۶۵	۱۶	۶۶۰۴۹/۶۵			۱۶	کل
۳/۳۲	۳/۳۲	۰/۹۲۸	۰/۹۲۸	۰/۹۸۰	۰/۹۸۰	۰/۸۳۵	۰/۸۳۵	۰/۹۶۴	۰/۹۶۴		۰/۹۶۴				ضریب تغییرات
۰/۹۴۷	۰/۹۴۷	۰/۸۸۶	۰/۸۸۶	۰/۹۷۳	۰/۹۷۳	۰/۸۱۱	۰/۸۱۱	۰/۹۴۸	۰/۹۴۸		۰/۹۴۸				R ²
۰/۹۱۶	۰/۹۱۶														Adj R ²

زمان (A)، دما (B) و درصد اتانول (C)؛ یک ستاره (۰/۰۵) $P \leq$ ، دو ستاره (۰/۰۱) $P \leq$ ، سه ستاره (۰/۰۰۱) $P \leq$ در سطح ۹۵ درصد معنی دار نمی‌باشد.

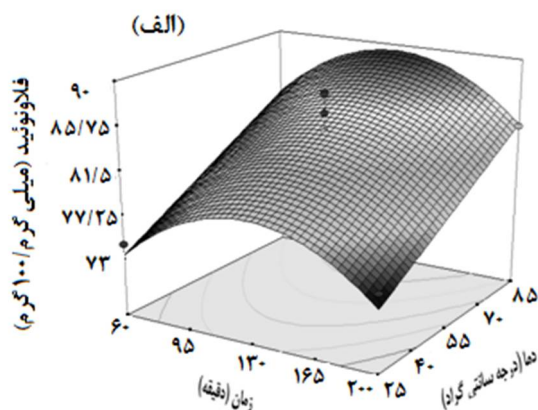
این ترکیبات را با افزایش دما تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد گزارش نمودند (Silva et al., 2007). همچنین با در نظر گرفتن معنی‌داری عبارت درجه دوم پارامتر زمان مشخص می‌گردد که با افزایش زمان استخراج تا حدود دقیقه ۱۳۵، میزان استخراج فلاونوئیدهای گلبرگ زعفران افزایش و پس از آن، کاهش یافت (شکل ۲، ب). این رفتار را می‌توان به طولانی شدن اثر دما و در نتیجه تخریب حرارتی این ترکیبات نسبت داد.

با توجه به ارزیابی مدل ارائه شده برای این پارامتر، مشخص می‌گردد که رابطه حاصل، از R^2 و R^2 (adj) متناسب، بالا و معنی‌داری ($P \leq 0/01$) برای پیشگویی برخوردار است (جدول ۳). آزمون ضعف برازش آن بی‌معنی ($P > 0/05$) و ضریب تغییرات آن نیز پایین ($2/72$) می‌باشد که تأیید کننده قدرت این مدل است.



تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان استخراج فلاونوئید

بررسی جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که دمای استخراج بیشترین تأثیر را بر مقدار استخراج فلاونوئید دارد. با توجه به نمودار رویه پاسخ مربوط به فلاونوئید که در شکل ۲، الف نشان داده است، پارامتر دمای استخراج موجب افزایش معنی‌دار ($P \leq 0/01$) استخراج فلاونوئیدها شد. از آنجا که کوئرستین، کامپفرول و میرستین از جمله ترکیبات فلاونوئیدی غالب در گلبرگ زعفران هستند که مقاومت حرارتی بالایی دارند لذا افزایش دما به دلیل افزایش انحلال‌پذیری، منجر به بالا رفتن بازده استخراج این ترکیبات گردیده است (da Costa et al., 2002). سایر محققین نیز در پژوهشی که بر روی برگ‌های گیاه *Inga edulis* انجام دادند، افزایش میزان



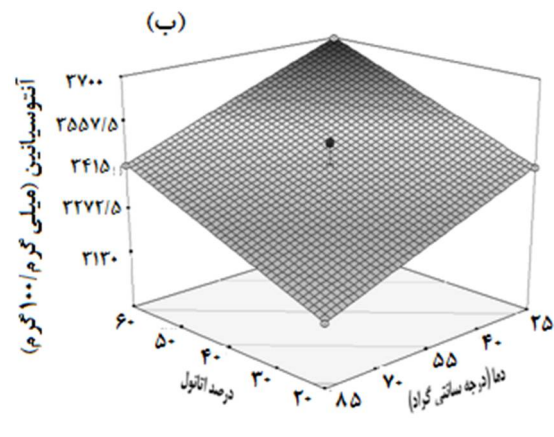
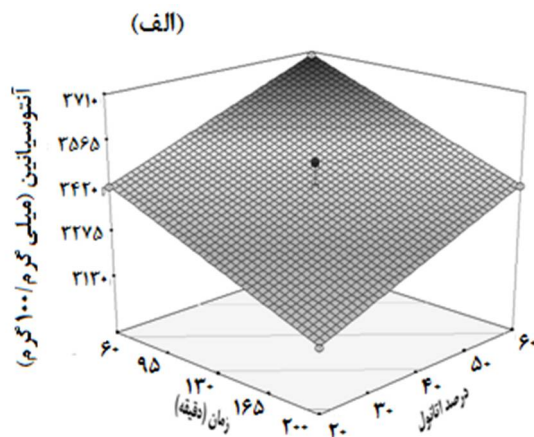
شکل ۲- اثر شرایط استخراج بر میزان فلاونوئید عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف: اثر زمان و دما، ب: اثر زمان و درصد اتانول.

پارامترهای استخراج، تأثیر بیشتری بر راندمان استخراج آنتوسیانین دارد. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که زمان و دمای استخراج موجب افزایش معنی‌دار ($P \leq 0/01$) در حالی که درصد اتانول موجب کاهش معنی‌دار ($P \leq 0/01$) بازده استخراج آنتوسیانین شد. بررسی تغییرات بازده استخراج آنتوسیانین، نشان می‌دهد که رابطه حاصل، از R^2 و R^2 (adj) متناسب، بالا و بسیار معنی‌داری ($P \leq 0/01$) برای پیشگویی برخوردار است (جدول

تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان استخراج آنتوسیانین

در جدول ۳، تجزیه واریانس متغیرهای وابسته در استخراج آنتوسیانین و ضرایب رابطه مناسب برای پیشگویی این خصوصیات ملاحظه می‌گردد. روند تغییر بازده استخراج آنتوسیانین با توجه به شرایط استخراج و به صورت نمودار رویه پاسخ در شکل ۳ مشاهده می‌گردد. بررسی جدول آنالیز واریانس نشان می‌دهد که زمان استخراج در مقایسه با سایر

دلیل طولانی‌تر شدن اثر تخریبی دما و حساسیت حرارتی بیشتر آنتوسیانین‌ها در مقایسه با ترکیبات پلی‌فنولی، کاهش خطی در میزان استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران مشاهده گردید (شکل ۳، ب). همچنین مشاهده نمودار سطح پاسخ در شکل ۳، ب نشان می‌دهد که افزایش درصد اتانول در حلال تا غلظت ۶۰ درصد، منجر به افزایش خطی بازده استخراج آنتوسیانین گردید. سایر محققین نیز در استخراج آنتوسیانین از توت سیاه، بیشترین بازده استخراج این ترکیبات را در غلظت ۵۰ درصد اتانول گزارش نمودند.



شکل ۳- اثر شرایط استخراج بر میزان آنتوسیانین عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف: اثر درصد اتانول و زمان، ب: اثر دما و درصد اتانول.

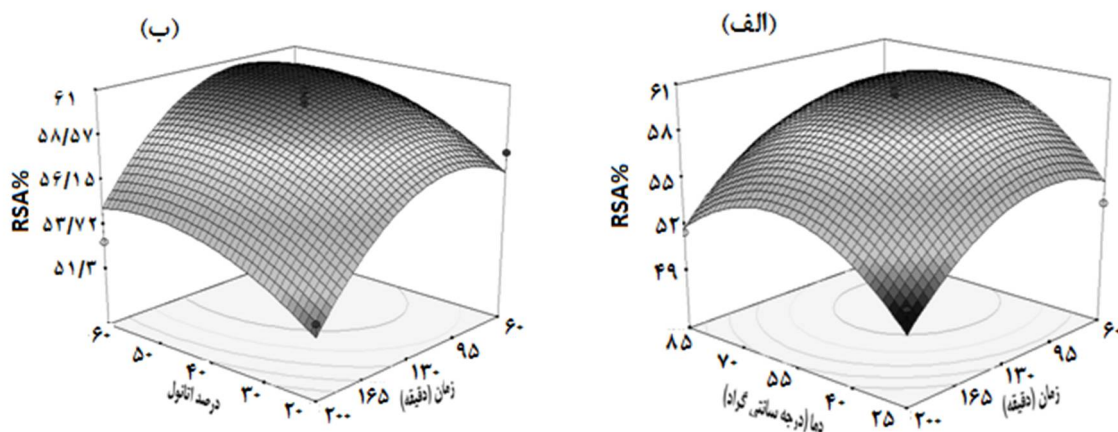
این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود می‌باشد. بررسی جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که عبارت درجه دوم پارامتر دما در مقایسه با سایر پارامترها، تأثیر بیشتری بر درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH دارد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس معنی‌دار بودن دما، زمان استخراج و درصد اتانول حلال و همچنین عبارت درجه دوم این پارامترها را نشان می‌دهد. بررسی رابطه بدست‌آمده برای درصد بازدارندگی رادیکال آزاد نشان می‌دهد که رابطه حاصل، از R^2 و R^2 (adj) متناسب، بالا و معنی‌داری ($P \leq 0.001$) برای پیشگویی آن برخوردار است. آزمون ضعف برازش آن بی‌معنی ($P > 0.05$) و ضریب تغییرات آن نیز پایین ($2/21$) می‌باشد که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است.

۳). آزمون ضعف برازش آن بی‌معنی ($P > 0.05$) و ضریب تغییرات آن نیز پایین ($0/99$) می‌باشد که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است. بر طبق نمودار رویه پاسخ مربوط به آنتوسیانین (شکل ۳، الف)، با افزایش دما، کاهش خطی در میزان این ترکیبات مشاهده گردید. در واقع افزایش دما سبب پلیمری شدن و تبدیل آنتوسیانین‌های مونومری به رنگدانه‌های قهوه‌ای یا بی‌رنگ می‌شود لذا در اندازه‌گیری به روش pH افتراقی، رنگ دانه‌های پلیمری در مقابل تغییرات pH تغییر رنگ نشان نمی‌دهند (Giusti & Wrolstad, 2003). با افزایش زمان نیز به

به نظر می‌رسد غلظت‌های مختلف اتانول در حلال باعث تغییر در ویژگی‌های فیزیکی حلال از جمله دانسیته، ویسکوزیته دینامیک و ثابت دی‌الکتریک آن می‌گردد. لذا حلالیت این ترکیبات با تغییر در غلظت اتانول می‌تواند دستخوش تغییر شده و منجر به افزایش بازده استخراج گردد (Cacace & Mazza, 2003).

تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله DPPH بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های آزاد DPPH در اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره خنثی شده و بی‌رنگ می‌گردد. لذا درجه بی‌رنگ شدن



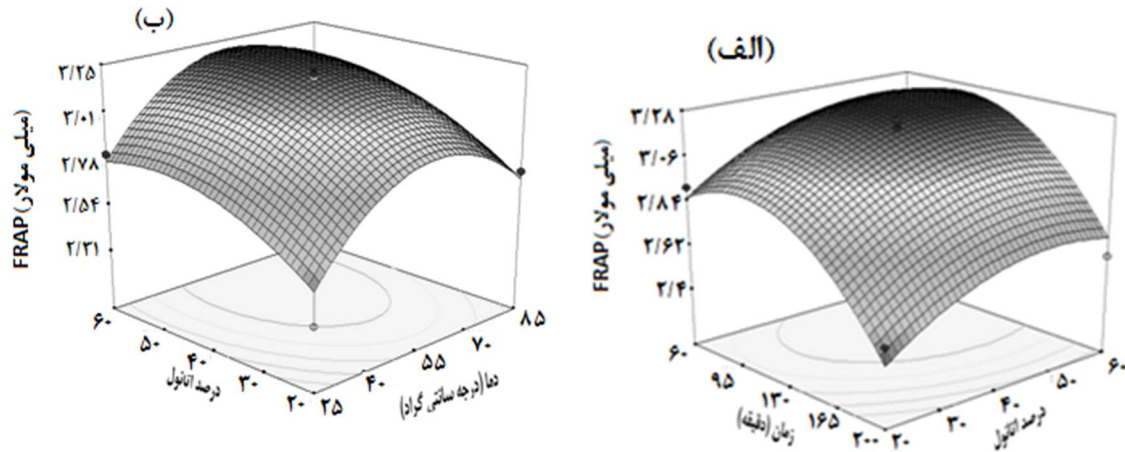
شکل ۴- اثر شرایط استخراج بر درصد مهار رادیکال آزاد عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف: اثر دما و زمان، ب: اثر زمان و درصد اتانول.

بازدارندگی، اما در درصدهای بالاتر اتانول، کاهش اندکی در میزان این شاخص مشاهده گردید. این امر احتمالاً به علت استخراج بالاتر ترکیبات پلی فنولی و آنتوسیانینی در این درصد اتانول می‌باشد.

اندازه گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن (FRAP) بررسی جدول آنالیز واریانس نشان می‌دهد که عبارت درجه دوم پارامتر دما در مقایسه با سایر پارامترهای استخراج، تأثیر بیشتری بر توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن دارد. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که زمان، دمای استخراج و درصد اتانول حلال و همچنین عبارات درجه دوم این پارامترها تأثیر معنی‌داری بر میزان این شاخص داشت. بررسی تغییرات توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن، نشان می‌دهد که رابطه حاصل، از R^2 و $R^2(\text{adj})$ متناسب، بالا و بسیار معنی‌داری ($P \leq 0.001$) برای پیشگویی برخوردار است (جدول ۳). آزمون ضعف برآزش آن بی‌معنی ($P > 0.05$) و ضریب تغییرات آن نیز پایین (۳/۳۲) می‌باشد که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است.

با توجه به نمودار رویه پاسخ مربوط به درصد بازدارندگی که در شکل ۴، ب نشان داده شده، پارامتر دمای استخراج ابتدا موجب افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) درصد بازدارندگی تا حدود دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و سپس کاهش آن با افزایش بیشتر دما شده است. با افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، افزایش میزان استخراج ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی نیز مشاهده گردید، از این رو افزایش درصد بازدارندگی را می‌توان به استخراج بالاتر این ترکیبات در این دما نسبت داد.

همچنین بر طبق نمودار رویه پاسخ در شکل ۴، ب با افزایش زمان استخراج تا حدود ۱۰۵ دقیقه، افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.001$) درصد بازدارندگی و پس از آن کاهش مقدار آن مشاهده گردید. طبق نتایج بدست‌آمده، میزان استخراج پلی فنول‌ها تا زمان ۱۱۰ دقیقه افزایش نشان داد، همچنین عبارت درجه دوم زمان در استخراج فلاونوئیدها نیز تا دقیقه ۱۳۰ افزایش معنی‌دار این ترکیبات را نشان داد. لذا افزایش درصد بازدارندگی را می‌توان به استخراج بیشتر این ترکیبات با افزایش زمان نسبت داد. بر طبق شکل ۴، الف در درصد اتانول ۵۰ درصد، بالاترین میزان درصد



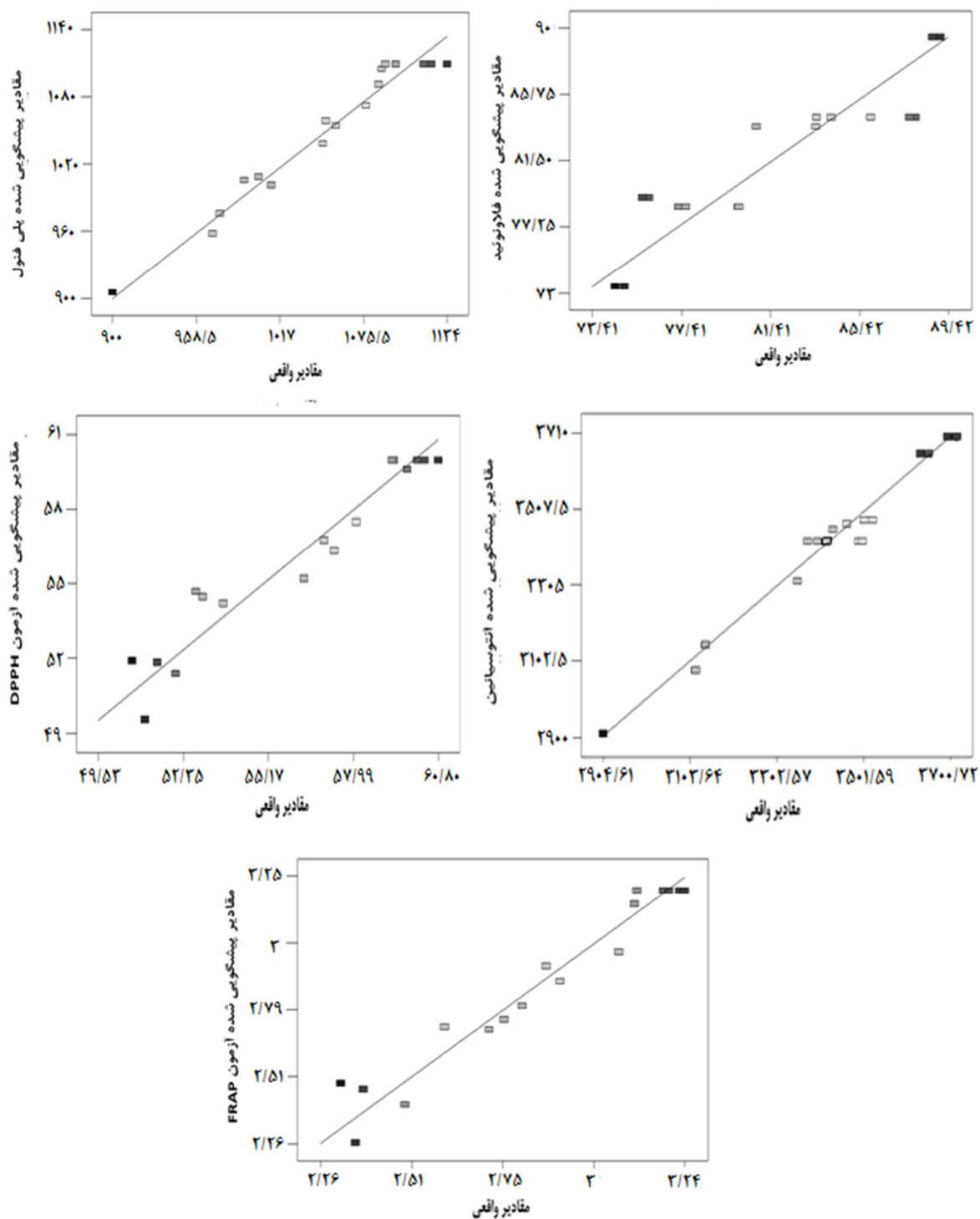
شکل ۵- اثر شرایط استخراج بر میزان توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف: اثر درصد اتانول و زمان، ب: اثر دما و درصد اتانول.

بود. به منظور بررسی صحت فرآیند بهینه‌سازی شده، تیمار پیشنهادی با شرایط یکسان همانند بقیه تیمارها تولید و نتایج حاصل از بازده ترکیبات پلی فنولی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، آزمون DPPH و آزمون FRAP با نتایج پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید. عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($P > 0.05$) بین مدل‌ها و مشاهدات تجربی کارایی مدل‌ها را به خوبی اثبات می‌کند که در تولید صنعتی می‌توان از آن‌ها استفاده کرد (شکل ۶).

بر طبق شکل ۵ (الف و ب) بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن در دمای حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان حدود ۹۷ دقیقه و در درصد اتانول حلال ۴۷ درصد مشاهده گردید. در این تحقیق همبستگی بالا و معنی‌داری بین نتایج بدست‌آمده از دو روش DPPH و FRAP وجود داشت (ضریب همبستگی برابر با $R^2 = 0.972$, $P < 0.0001$).

بهینه‌سازی

بهینه‌سازی استخراج عصاره گلبرگ زعفران به منظور حصول حداکثر بازده استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی انجام شد. نتایج نشان داد، در صورتی که زمان استخراج ۱۰۴/۲۹ دقیقه، دمای استخراج ۶۶/۳۱ درجه سانتی‌گراد و درصد اتانول حلال ۵۸/۹۶ باشد، بیشترین بازده استخراج حاصل می‌گردد. در این شرایط میزان ترکیبات پلی فنولی، ۱۱۳۴ (میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک)؛ فلاونوئید، ۸۵/۴۴ (میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک)؛ آنتوسیانین، ۳۵۸۴/۱۳ (میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک)؛ درصد به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، ۶۰/۶۰ درصد و توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن، ۳/۲۴ میلی‌مولار خواهد



شکل ۶- مقایسه مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استخراج شده از گلبرگ زعفران و درصد مهار رادیکال‌های آزاد آن.

نتیجه‌گیری

است. مشخص گردید که از میان این پارامترها، زمان تأثیر بیشتری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته است و دمای استخراج و درصد اتانول حلال نسبت به زمان، شدت تأثیر کمتری داشته‌اند. مدل‌های پیشنهادی در این پژوهش، دارای مقادیر R^2 (adj), R^2 بالایی هستند که ضعف برازش بی‌معنی و نیز ضریب تغییرات پایین آنها نشان‌دهنده کارایی مدل‌های ارائه شده در پیش‌بینی پارامترهای مورد ارزیابی است. با استفاده از این مدل‌ها از سویی می‌توان شرایط استخراج را تنظیم نمود و از طرفی می‌توان با توجه به شرایط مورد استفاده در استخراج، خصوصیات مورد نظر را پیش‌بینی و اصلاح نمود.

آنالیز سطح پاسخ مربوط به طرح باکس‌بنکن با سه متغیر مستقل شامل زمان، دمای استخراج و درصد اتانول به عنوان پارامترهای مؤثر بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گلبرگ زعفران به انجام رسید. نتایج بدست‌آمده حاکی از آن بودند که متدلوژی رویه پاسخ را می‌توان به خوبی در ارزیابی بازده فرآیند استخراج، به کاربرد. هر سه پارامتر زمان، دمای استخراج و نیز درصد اتانول حلال، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارها شده‌اند. همچنین، مشخص گردید که از میان این پارامترها، عبارت درجه دوم و نیز برهم‌کنش آنها در برخی موارد تأثیرگذار بوده

منابع

- 1- Basti, A.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*, 31:439-442.
- 2- Benzie, I.F., & 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.
- 3- Cacace, J.E., & Mazza, G. 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68:240-248.
- 4- Catoni, C., Schaefer, H.M., & Peters, A. 2008. Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immune response and food selection in a frugivorous bird. *Functional Ecology*, 22:649-654.
- 5- da Costa, E.M., Barbosa Filho, J.M., do Nascimento, T.G., & Macêdo, R.O. 2002. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochimica acta*, 392:79-84.
- 6- Esmaili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., & Safarian, S. 2011. Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. *Pharmacognosy magazine*, 7:74-80.
- 7- Fatehi, M., Rashidabady, T., & Fatehi-Hassanabad, Z. 2003. Effects of *Crocus sativus* petals' 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*, 84:199-203.
- 8- Gan, C.Y., & Latiff, A.A. 2011. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food chemistry*, 124:1277-1283.
- 9- Giusti, M.M., & Wrolstad, R.E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14:217-225.
- 10- Hosseinzadeh, H., & Younesi, H.M. 2002. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC pharmacology*, 2:7.

- 11-Kaur, G., Jabbar, Z., Athar, M., & Alam, M.S. 2006. Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food and chemical toxicology, 44:984-993.
- 12-Kazuma, K., Noda, N., & Suzuki, M. 2003. Flavonoid composition related to petal color in different lines of Clitoria ternatea. Phytochemistry, 64:1133-1139.
- 13-Lee, J., Durst, R.W., & Wrolstad, R.E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC international, 88:1269-1278.
- 14-Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food chemistry, 93:47-56.
- 15-McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., & Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food chemistry, 73:73-84.
- 16-Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., & van Leeuwen, P.A. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American journal of clinical nutrition, 74:418-425.
- 17-Pompeu, D.R., Silva, E.M., & Rogez, H. 2009. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. Bioresource technology, 100:6076-6082.
- 18-Rodrigues, S., Pinto, G.A.S., & Fernandes, F.A.N. 2008. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. Ultrasonics sonochemistry, 15:95-100.
- 19-Sánchez-Vioque, R., Rodríguez-Conde, M.F., Reina-Ureña, J.V., Escolano-Tercero, M.A., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O. 2012. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). Industrial Crops and Products, 39:149-153.
- 20-Silva, E.M., Rogez, H., & Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology, 55:381-387.
- 21-Termentzi, A., & Kokkalou, E. 2008. LC-DAD-MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of crocus sativus petal extracts. Planta medica, 74:573-581.
- 22-Ulbricht, C., Conquer, J., Costa, D., Hollands, W., Iannuzzi, C., Isaac, R., Jordan, J.K., Ledesma, N., Ostroff, C., Serrano, J.M., Shaffer, M.D., & Varghese, M. 2011. An evidence-based systematic review of saffron (*Crocus sativus*) by the natural standard research collaboration. Journal of dietary supplements, 8:58-114.
- 23-von Gadow, A., Joubert, E., & Hansmann, C.F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. Journal of agricultural and food chemistry, 45:632-638.
- 24-Weisburger, J.H. 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. Food and chemical toxicology, 37:943-948.
- 25-Wettasinghe, M., & Shahidi, F. 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. Food chemistry, 67:399-414.
- 26-Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. 2012. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4:675-682.

- 27-Zheng, C.J., Li, L., Ma, W.H., Han, T., & Qin, L.P. 2011. Chemical constituents and bioactivities of the liposoluble fraction from different medicinal parts of *Crocus sativus*. *Pharmaceutical biology*, 49:756-763.
- 28-Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64:555-559.

Optimization of Extraction Conditions of Bioactive Components from Saffron Petal Using Response Surface Method (RSM)

Zahra Ahmadian-Kouchaksaraie^{1*}, Razieh Niazmand², Masoud Najaf Najafi³

1- Graduated PhD. Student, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad.

* Corresponding author (Ahmadian.zr@gmail.com)

2- Assistant Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad.

3- Assistant Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad.

Abstract

Saffron which has traditionally been used in different industries as well as in folk medicine, is considered one of the valuable resources of antioxidant. However, there is little information about extraction of antioxidant compound from different parts of this plant especially its petal. Solvent-assisted extraction is considered one of the most important methods for extraction of the most valuable compounds from plant sources and is applicable in both laboratory and industrial scales. In this study, box-behnken design was used in order to investigate the effect of time (60-200 min), temperature (25-85° C) and ethanol percentage (20–60 %) on the yield of polyphenol, flavonoid and anthocyanin, and also the antioxidant activity and optimization of extraction process. Results showed that maximum yield of antioxidant compounds is achieved with extraction time of 104.29 min, extraction temperature of 66.31° C and ethanol percentage of 58.96%. Under these conditions, the values were 1134 (mg gallic acid/100 g) for polyphenol, 85.44(mg quercetin/100 g) for flavonoid, 3584.13(mg/100 g) for anthocyanin, 60.60% for DPPH free radical scavenging activity and 3.24 (mM) for ferric ion reducing antioxidant power.

Keywords: anthocyanin, antioxidant, polyphenol, response surface methodology, saffron petal