



Experimental Surface-Response Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals Using Citric Acid Solvent

Seyed Mohammad Reza Naghibi Hoseini¹, Hosein Ali Akhlaghi Amiri^{2*}, Ali Garmroudi Asil³, Mahmoud Mohammadzadeh⁴, and Abbas Hemmati Kakhki⁵

Submitted: 5 December 2021
Revised: 28 December 2021
Accepted: 22 January 2022
Available Online: 20 January 2022

How to cite this article:

Naghibi Hoseini, S.M.R., Akhlaghi Amiri, H.A., Garmroudi Asil, A., Mohammadzadeh, M., Hemmati Kakhki, A. 2022. Experimental Surface-Response Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals Using Citric Acid Solvent. *Saffron Agronomy & Technology*, 10(1): 51-68.
DOI: 10.22048/jsat.2022.318422.1445

Abstract

Saffron petals are known as one of the richest sources of anthocyanin. Considering the significant production statistics of this plant and the high consumption of anthocyanin as an authorized food color in Iran, its industrial extraction can be worth to be considered. In this study, with an industrial approach (determination of parameters considering industrial extraction), conditions for extracting monomeric anthocyanin from saffron petals using a single solvent of citric acid have been investigated for the first time. Among the reasons for this choice to replace other solvents studied in previous studies, we can mention the availability and allowability of this substance in the food industry. The variables of solvent to dry plant tissue ratio in the range of 10 to 60 ml/g, extraction temperature in the range of 25 to 35 °C, solvent concentration percentage in the range of 5 to 20 and extraction time of 2 to 120 minutes were considered for this experiment. After obtaining the most appropriate model for the laboratory data output, extraction conditions were optimized to achieve the highest amount of extracted anthocyanin using the surface-response method. The solvent to dry petals ratio was recognized as the most significant extraction variable according to the obtained coefficients. Solvent ratio to dry petals of 10 ml/g, solvent concentration percentage of 5.04, extraction temperature of 25 °C, and extraction time of 179.555 minutes was determined as the optimal extraction conditions. Extraction time of up to 180 minutes was considered to optimize. The model predicted that the amount of extracted anthocyanin in the optimal conditions was 688.944 mg.l⁻¹.

Keywords: Anthocyanin, Extraction, Surface-Response, Saffron petals, Citric acid

1- MSc. Student, Department of Chemical Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, University of Bojnord, Bojnord, Iran

4- MSc., Zarrin Golbarg Khorasan, Khorasan, Iran

5- MSc., Iranian Association of Saffron Sciences, Mashhad, Iran

(*- Corresponding author Email: ha.akhlaghi@um.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2022.318422.1445



مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی آزمایشگاهی به روش سطح-پاسخ در استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران با استفاده از حلال اسیدستریک

سید محمدرضا نقیبی حسینی^۱، حسینعلی اخلاقی امیری^{۲*}، علی گرمودی اصیل^۳، محمود محمدزاده^۴، عباس

همتی کاخکی^۵

تاریخ دریافت: ۱۴ آذر ۱۴۰۰

تاریخ بازنگری: ۷ دی ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۲ بهمن ۱۴۰۰

نقیب حسینی، س. م. ر.، اخلاقی امیری، ح.، گرمودی اصیل، ع.، محمدزاده، م. و همتی کاخکی، ع. ۱۴۰۱. بهینه‌سازی آزمایشگاهی به روش سطح-پاسخ در استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران با استفاده از حلال اسیدستریک. زراعت و فناوری زعفران، ۱۰ (۱): ۶۸-۵۱.

چکیده

گلبرگ زعفران به عنوان یکی از منابع سرشار از آنتوسیانین شناخته می‌شود. با توجه به ماهیت ضایعاتی این بافت گیاهی در حال حاضر و آمار تولید قابل توجه این گیاه و مصرف بالای آنتوسیانین به عنوان رنگ خوراکی مجاز در کشور ایران، می‌توان استخراج صنعتی آن را مد نظر قرار داد. در این پژوهش برای اولین بار با رویکردی صنعتی (تعیین پارامترها با در نظر گرفتن استخراج صنعتی) شرایط استخراج آنتوسیانین منومری از گلبرگ زعفران با استفاده از تک حلال اسیدستریک مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله دلایل این انتخاب برای جایگزین سایر حلال‌های مورد بررسی قرار گرفته مطالعات پیشین، می‌توان به در دسترس و مجاز بودن مصرف این ماده در صنعت غذایی اشاره کرد. متغیرهای نسبت حلال به بافت گیاهی خشک در بازه ۱۰ الی ۶۰ میلی‌لیتر بر گرم، دمای استخراج در بازه ۲۵ الی ۳۵ درجه سانتی‌گراد، درصد غلظت حلال در بازه ۵ الی ۲۰ و زمان استخراج ۲ الی ۱۲۰ دقیقه برای انجام آزمایش‌ها در نظر گرفته شدند. جهت بدست آوردن بهترین شرایط استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران، مدل بدست آمده از روش سطح-پاسخ مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. با توجه به ضرایب بدست آمده، نسبت حلال به گلبرگ، شاخص‌ترین متغیر استخراج شناخته شد. نسبت حلال به گلبرگ ۱۰ میلی‌لیتر بر گرم، درصد غلظت حلال ۵/۰۴، دمای استخراج ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۱۷۹/۵۵۵ دقیقه به عنوان شرایط بهینه استخراج تعیین شدند. برای بهینه‌سازی، زمان استخراج تا ۱۸۰ دقیقه در نظر گرفته شد. پیش‌بینی مدل نیز از میزان آنتوسیانین استخراجی در زمان بهینه ۶۸۸/۹۴۴ میلی‌گرم بر لیتر بود.

کلمات کلیدی: آنتوسیانین، استخراج، روش سطح-پاسخ، گلبرگ زعفران، اسیدستریک

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مهندسی شیمی گرایش طراحی فرآیند دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه بجنورد، بجنورد، ایران

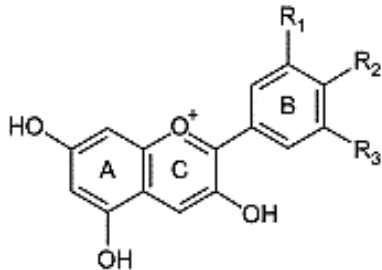
۴- کارشناسی ارشد، شرکت زرین گلبرگ خراسان، پارک علم و فناوری تربیت حیدریه، خراسان، ایران

۵- کارشناسی ارشد، جمعیت ایرانی علوم زعفران، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

*- نویسنده مسئول: ha.akhlaghi@um.ac.ir

مقدمه

درصد وزنی اجزا تشکیل دهنده گل زعفران را به صورت داده های جدول ۱ گزارش کردند (Hemmati Kakhki et al., 1994).



شکل ۱ - ساختار شیمیایی آنتوسیانین

Figure 1 - Chemical structure of anthocyanin.

با توجه به بالا بودن میزان تولید سالانه زعفران در ایران، حجم بالایی از این ماده ارزشمند، پس از جداکردن مادگی، بدون استفاده در طبیعت رها می‌شود. این گلبرگ زعفران حاوی رنگدانه آنتوسیانین، دیگر ترکیبات فلاونوئیدی و مشتقات گلیکوزیدی^۳ آنها می‌باشد. مازاد بر این‌ها، ایران بزرگترین تولیدکننده 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. براساس آمارنامه کشاورزی، در سال زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹، حدود ۴۴۰ تن زعفران براساس وزن خشک تولید شده است. از هر ۷۸ کیلوگرم گل به‌طور معمول ۱ کیلوگرم زعفران (کلاله همراه باخامه) حاصل می‌شود. از این‌رو، سالانه حدود ۴۶۵۸ تن گلبرگ زعفران بر اساس وزن خشک به‌عنوان محصول جانبی تولید خواهد شد. با توجه به پژوهش همتی کاخکی و همکاران در سال ۱۳۷۳، از هر ۷ کیلوگرم گلبرگ تر، یک کیلوگرم گلبرگ خشک حاصل خواهد شد که در آن ۷ گرم آنتوسیانین وجود دارد. از طرفی غلظت آنتوسیانین در نمونه‌های خارجی موجود در بازار حداکثر ۲ گرم در لیتر می‌باشد؛ بنابراین می‌توان با در نظر گرفتن

امروزه، با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در مورد نیاز به عادات غذایی سالم، این صنعت تلاش کرده است تا منابع افزودنی طبیعی را پیدا کند تا در عین حالی که کاملاً ایمن باشند، مزایایی برای سلامتی بیشتر انسان را نیز به همراه داشته باشند. باتوجه به این امر، آنتوسیانین‌ها ممکن است یک گروه جالب و تحریک برانگیز از ترکیبات باشند. آنها را می‌توان در میوه‌ها و سبزیجات مختلف رنگی مانند: توت قرمز، چغندر، کلم قرمز، انار، انگور، هویج سیاه و غیره یافت؛ بنابراین مصرف آنها بی‌خطر است (Hemmati Kakhki et al., 1994).

افراد محقق در مورد پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آنتوسیانین گزارش کرده‌اند؛ دو خاصیتی که ممکن است در تثبیت مواد غذایی و افزایش ماندگاری آنها کمک کند. علاوه بر این، با توجه به قدرت رنگی زیاد، آن‌ها جایگزین طبیعی جالبی برای رنگ‌های غذایی قرمز و بنفش هستند و ممکن است برخی از مزایای سلامتی را نیز به همراه داشته باشند (Carvalho et al., 2015; Ghiselli et al., 1998; Kong et al., 2003; Tedesco et al., 2001; Azghandi Fardaghi et al., 2021).

این رنگ دانه طبیعی متعلق به دسته بزرگی از ترکیبات شیمیایی به نام فلاونوئیدها^۱ بوده که طی چرخه فونیلپیر و پانوئید^۲ مطابق شکل ۱ ساخته می‌شود. (Castañeda-Ovando et al., 2009)

گیاه زعفران که در پژوهش کافی در سال 2006 از آن به عنوان گرانبهاترین ادویه دنیا یاد شده است، دارای گل‌های بنفش رنگی بوده که پس از جداکردن مادگی از آن‌ها، غالباً دورریخته می‌شوند (Kafi, 2006). همتی کاخکی و همکاران در مطالعه‌ای جامع بر روی استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران،

۱- Flavonoids

۲- Phenylpropanoid Pathway

۳- Glycoside

مختلف حلال (متانول، اتانولوب) و اسید (اسید کلریدریک، سیتریک اسید، استیک اسید، پروپیونیکاسید، تارتاریک اسید و اسیدفرمیک) را براستخراج آنتوسیانین از تفاله شراب بررسی کردند که متانول بهترین حلال استخراج می‌باشد. (به ترتیب ۲۰ و ۷۳ درصد بیشتر از اتانول و آب، آنتوسیانین استخراج گردید). اگرچه نوع اسید مورد استفاده به طور متفاوتی بر روی هر حلال تأثیری گذارد، اما متانول همراه با اسید سیتریک بهترین ترکیب برای استخراج انتخاب گردید (Metivier et al., 1980). اگرچه به نظر می‌رسد افزودن اسید به روند استخراج کمک کند، اما از طرفی ممکن است استفاده از اسیدهای قوی باعث هیدرولیز^۲ پیوند گلیکوزیدیک^۳ شود و یک آنتوسیانیدین و یک نوع قند تولید کند (Castañeda-Ovando et al., 2009; Kapasakalidis et al., 2006). از دیگر پارامترهای مهم در استخراج آنتوسیانین‌ها، دما است که در پژوهش‌های متعددی اثرات دما بر استخراج آنتوسیانین بررسی شده‌اند. کاکاسه و ماتزا در پژوهش خود در سال 2003، گزارش دادند برای انگورسیاه، ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد بهترین دما برای استخراج آنتوسیانین است (Cacace & Mazza, 2003). همتی کاخکی و همکاران (Hemmati Kakhki et al., 1994) در مطالعه سال ۱۳۷۳ استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران را با استفاده از چهار حلال مختلف از جمله اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال + اتانول ۹۵٪، اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال + اتانول ۹۵٪ و اسید سیتریک ۱۰٪ (حجمی/وزنی) و طی چهار زمان متفاوت استخراج (۲ دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۲ ساعت و چهار ساعت) و در چندین تکرار بررسی کردند که نشان داده شد استفاده از اسید کلریدریک نرمال و زمان استخراج کوتاه (۲ دقیقه و ۳۰ دقیقه) ضمن بازیافت رنگ بیشتر، کمترین میزان ناخالصی را به همراه داشته است. در مرحله بعدی اسید سیتریک

استخراج با راندمان ۷۰ درصدی، از هر کیلوگرم گلبرگ خشک، حدود ۲ لیتر رنگ قرمز خوراکی استخراج نمود. (Hemmati Kakhki et al., 1994) با ارزیابی بازار و طبق گزارش‌های آماری و میدانی موجود، سالانه بیش از ۲۰۰۰ تن آنتوسیانین در کشور ایران مصرف می‌گردد که اغلب از کشورهای انگلیس، فرانسه و چین و به ترتیب از منابع هویج سیاه، انگور قرمز و کلم قرمز تامین می‌شوند.

جدول ۱- اجزای گل

Table 1- Saffron flower components (Percentage)

| بخش Type | درصد وزنی Weight percentage (%) |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| گلبرگ و کاسبرگ Petals and sepals | 86.42 |
| پرچم Stamen | 5.935 |
| کلاله و خامه Stigma and style | 7.645 |

رویگرد کلاسیک مورد استفاده برای استخراج آنتوسیانین‌ها از بافت‌های گیاهی همان روشی است که برای سایر ترکیبات فنولی نیز استفاده می‌شود؛ یعنی در فرآیندی که به نام استخراج جامد-مایع (SLE)^۱ شناخته می‌شود، بافت‌ها برای استخراج باحلال مورد نظر خیس می‌شوند. پارامترهای مختلفی بر عملکرد استخراج جامد-مایع تأثیرگذار است؛ معمولاً در متون منتشر شده نوع حلال و درجه حرارت مهم‌ترین پارامترهای استخراج هستند؛ چندین پارامتر دیگر مانند زمان استخراج، اندازه ذرات و نسبت حلال به جرم نیز بررسی شده‌اند (Castañeda-Ovando et al., 2009; Vrhovsek et al., 2012). بیشتر حلال‌های رایج مورد استفاده در استخراج جامد-مایع، قطبی هستند که از متانول، اتانول، است و نو حتی آب اسیدی شده در کنار طیف وسیعی از اسیدهای آلی و معدنی می‌توان استفاده کرد. در دهه ۸۰، (Metivier., 1980) اثر ترکیبات

۲- Hydrolysis

۳- Glycosidic bonding

۱- Solid-Liquid Extraction

در این پژوهش که تعیین مقادیر پارامترهای استخراج با رویکردی صنعتی صورت پذیرفته است، از متغیرهای نسبت حلال به حل شونده بر حسب میلی‌لیتر بر گرم، زمان استخراج بر حسب دقیقه، دمای استخراج بر حسب درجه سانتی‌گراد و درصد غلظت حلال برای مدل کردن و بهینه‌سازی شرایط استخراج بر حسب میلی‌گرم بر لیتر استفاده شده است. در هیچ یک از پژوهش‌های پیشین، حلال اسیدسیتریک به تنهایی بر روی استخراج آنتوسیانین استحصال شده از گلبرگ گیاه زعفران بررسی نشده است و دلیل استفاده از این حلال اسیدسیتریک به عنوان یک حلال مجاز در صنایع غذایی شناخته شده و در صورت بازدهی مناسب، می‌تواند به عنوان یک حلال مطمئن در تجاری‌سازی و تولید آنتوسیانین از گلبرگ زعفران از آن استفاده نمود. حد بالای زمان استخراج با توجه به رویکرد صنعتی ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته شده است. مدلسازی و پیدا کردن شرایط بهینه با هدف بیشترین میزان استخراج آنتوسیانین منومری بر پایه سیانیدین تری گلیکوزید^۳ به کمک روش سطح-پاسخ تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

گل زعفران از یکی مزرعه‌های تربت‌حیدریه در خراسان رضوی جمع‌آوری گردید. گل‌ها پس از جدا کردن پرچم و مادگی، در داخل خشک کن حرارتی با دمای حدود ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد با حضور دمنده به منظور تسریع در خشک کردن قرار گرفته و تا زمان کامل خشک شدن یک مرتبه زیر و رو نیز شدند. تا حد امکان مواد اضافی و مزاحم گل‌ها گرفته و پاک شدند و تا زمان انجام آزمایش‌ها در محیطی خشک، خنک و

۱۰ درصد (حجمی/وزنی) بهترین حلال بوده و دوحلال دیگر کارایی لازم را نداشتند.

در یک پژوهش مشابه، خزاعی مهدوی و همکاران در سال ۱۳۹۳ شرایط بهینه استخراج آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران را بوسیله حلال اتانول اسیدی تعیین کردند. متغیرهای مستقل در مطالعه ایشان شامل نسبت حلال به نمونه (۲۰ تا ۸۰ میلی‌لیتر حلال بر گرم نمونه)، درصد اتانول (۷۵ تا ۲۵ درصد)، دما (۲۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۸ تا ۲۴ ساعت) بود. ضرایب واریانس به دست آمده در مطالعه آن‌ها 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 استخراج ۲۵/۸ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۲۴ ساعت به عنوان شرایط بهینه استخراج مشخص شدند. آن‌ها در شرایط بهینه خود ۱۶۰۹ میلی‌گرم آنتوسیانین به ازای هر لیتر عصاره گلبرگ زعفران استحصال کردند (Mahdavee Khazaei et al., 2014).

در پژوهش پاراباواتی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی استخراج آنتوسیانین از یک بافت گیاهی دریافتند که استخراج به وسیله حلال اسیدسیتریک بهترین عملکرد را نسبت به سایر حلال‌های الکلی مختلف داشته است (Parabavathy et al., 2017). به طوری که این حلال نسبت به سایرین بیشترین پایداری را از خود به جای گذاشته است و همچنین DSSC^۱ طبیعی با استفاده از اسیدسیتریک به عنوان حلال، کارایی ۰/۸۳٪ بالاتر را در مقایسه با سایر حلال‌ها نشان می‌دهد. در دیگر پژوهش مرتبط، بهترین تیمار استخراج از پوست یک میوه دراگون^۲ فروت در نسبت حلال به نمونه ۱ به ۳ و استفاده از حلال اسیدسیتریک ۱۰ درصد در مدت زمان خیساندن ۴ روز با بازدهی مناسبی به دست آمد (Ni et al., 2020).

۱- Dye Sensitized Solar Cells

۲- Dragon Fruit

۳- Cyanidin 3-Glucoside

اعمال گردیده است. شرایط هر آزمون از جمله دما، نسبت حلال، درصد غلظت حلال و زمان بر اساس سطوح متغیرهای پیش بینی شده در طرح مطابق جدول ۲ در نظر گرفته شد. آنتوسیانین موجود در عصاره حاصل بعد از یک بار صاف کردن با پارچه مخصوص برای جدا کردن تفاله‌های گلبرگ و پس از آن عبور از یک مرحله کاغذ صافی واتمن^۵ شماره ۱ به همراه خلأ، به روش pH افتراقی^۶ اندازه گیری محاسبه شد (Fuleki & Francis, 1968).

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 اسپکتروفوتومتر^۷ (دو پرتویی فرابنفش-مرئی Spectrum Instruments مدل SP-UV 300SRB) صورت گرفت. این روش در پژوهش لی و رولستاد در سال ۲۰۰۸ مورد استفاده قرار گرفته بود (Lee & Wrolstad, 2008). مقدار جذب نمونه به کمک معادله ۱ و میزان آنتوسیانین بر حسب میلی گرم بر لیتر عصاره به کمک معادله ۲ محاسبه می‌شوند:

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{\lambda 700nm}) pH_{1.0} - (A_{\lambda_{max}} - A_{\lambda 700nm}) pH_{4.5} \quad (1)$$

$$Y = \frac{(A \times MW \times DF \times 1000)}{\epsilon \times L} \quad (2)$$

که در این دو معادله، A: مقدار جذب نمونه، Y: میزان آنتوسیانین بر حسب میلی گرم بر لیتر، $A_{\lambda_{max}}$: بیشترین جذب بدست آمده (پیک نمودار)، MW: وزن مولکولی سیانیدین تری گلیکوزید بر اساس گرم بر مول، DF: فاکتور رقت^۸، ϵ : عدد ثابت

تاریک نگهداری گردیدند. برای انجام آزمون‌ها و به منظور ایجاد سطح تماس بیشتر با حلال، گلبرگ‌ها توسط آسیاب خانگی تا اندازه ذرات بین ۲ تا ۴ میلی متر کوچک شدند.

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از: اسیدسیتریک (به عنوان حلال)، بافر سدیم استات سه آبه^۱ (بافر با pH=4.5)، بافر پتاسیم کلرید^۲ (بافر با pH=1) و پتاسیم سوربات^۳ تمامی مواد شیمیایی و حلال مورد استفاده در این پژوهش از شرکت‌های معتبر و به ترتیب با درجه^۴ آزمایشگاهی و خوراکی تهیه شدند. برای تهیه حلال‌ها از مخلوط اسیدسیتریک و آب مقطر با درصدهای (وزنی/حجمی) ۵، ۱۲/۵ و ۲۰ درصد استفاده شد. بدین صورت که با ثابت در نظر گرفتن حجم تمامی نمونه‌های آزمایش بر روی ۶۰ میلی لیتر، با توجه به درصد مدنظر، جرم متناسبی از اسید به آب اضافه گردید. بافرهای ۱ و ۴/۵ بر اساس روش هی و گیوستی که در پژوهش سال ۲۰۱۱ خود ارائه دادند تهیه شدند (He & Giusti, 2011).

استخراج

استخراج عصاره گلبرگ زعفران پس از انجام آزمون‌های اولیه لازم جهت به دست آوردن سطوح هر یک از متغیرها، به کمک روش خیساندن مطابق با پژوهش فولکی و فرانسیس در سال ۱۹۶۸، به عنوان اساس استخراج در این پژوهش قرار گرفت. در این مطالعه، از روش مورد استفاده برای استخراج پژوهش همتی کاخکی و همکاران در سال ۱۳۷۳ (Hemmati et al., 1994) و مهدوی خزاعی و همکاران (Mahdavee Khazaei et al., 2014) در سال ۱۳۹۳ الگو گرفته شده است؛ هر چند تغییراتی برای بررسی اهداف این پژوهش

۵- Whatman

۶- pH Differential Method

۷- Spectrophotometer

۸- Dilution Factor

۱- Sodium Acetate Trihydrate

۲- Potassium Chloride

۳- Potassium Sorbate

۴- Grade

گلبرگ زعفران منبع بسیار غنی از انواع آنتوسیانین‌ها می‌باشد.

۲۶۹۰۰ که برابر با جذب مولی سیانیدین تری گلیکوزید است، L: قطر سلول اسپکتوفوتومتر بر حسب سانتی‌گراد و ۱۰۰۰ که برای تبدیل گرم به میلی‌گرم می‌باشد.

تأثیر متغیرهای مختلف استخراج بر میزان استخراج آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین استخراج شده در هر تیمار بر حسب میزان میلی‌گرم سیانیدین تری گلیکوزید در هر لیتر عصاره در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها، و بر اساس مقادیر F و P، مدل مناسب جهت برآزش داده‌ها بدست آمد (جدول ۴). این مقادیر، احتمال خطاهایی را نشان می‌دهند که در پذیرفتن معتبر بودن نتایج مشاهده شده وجود دارد؛ به این معنا که نتایج مشاهده‌شده به‌خوبی جامعه را بازنمایی می‌کند. پارامترهای A، B، C و D متغیرهای مستقل و به ترتیب بیانگر زمان، درصد غلظت حلال، دما و نسبت حلال به گلبرگ می‌باشند. داده‌های حاصل از تحلیل واریانس نشان داد دو متغیر درصد غلظت حلال و نسبت حلال به گلبرگ در حالت خطی دارای اثر معنی‌دار در مدل بودند ($P \leq 0.01$). در عبارات درجه دو، تنها نسبت حلال به گلبرگ و در اثر متقابل متغیرهای درصد غلظت حلال-نسبت حلال به گلبرگ ($P \leq 0.01$) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۵).

با توجه به اطلاعات جدول ۵، مدل درجه دو چند جمله‌ای (رگرسیون) برای استخراج آنتوسیانین به صورت رابطه کد شده زیر بدست آمده است:

(۴)

$$Y_{\text{Anthocyanin}} = 166.21 + 11.06A - 26.56B - 6.57C - 206.04D + 1.06AB + 0.4710AC + 1.63AD - 2.01BC + 38.95BD + 3.8CD + 19.38A^2 - 18.23B^2 + 3.92C^2 + 163.15D^2$$

و معادله مدل بر اساس مقادیر واقعی متغیرها نیز به صورت

زیر می‌باشد:

(۵)

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی اثر چهار متغیر مستقل بر میزان آنتوسیانین استخراج شده از روش سطح-پاسخ^۱ و طرح باکس-بنکن^۲ استفاده شد. آزمون‌ها شامل ۳۴ تیمار با پنج تکرار در نقطه مرکزی بود. معنادار بودن آماری عبارات در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. جهت برآزش داده‌ها و ترسیم نمودارها از نرم افزار دیزاین اکسپرت^۳ نسخه (Stat-Ease, Inc.), Minneapolis, MN55413, V.11.1.1.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

میزان آنتوسیانین منومری استخراج شده بر حسب میلی‌گرم از هر گرم گلبرگ خشک بر اساس رابطه استفاده شده در پژوهش آملیاو همکاران در سال ۲۰۱۳ از رابطه زیر بدست آمد (Amelia et al., 2013):

$$Y' = \frac{(A \times MW \times DF \times V)}{\varepsilon \times L \times Wt} \quad (۳)$$

که در این معادله، Y' : میزان آنتوسیانین بر حسب میلی‌گرم بر گرم گلبرگ خشک، V : حجم نهایی محلول استخراج شده و Wt : جرم بافتگیاهی خشک بر حسب گرم می‌باشد.

در این پژوهش، حد پایین و بالای میزان آنتوسیانین استخراج شده به ازای هر گرم گلبرگ خشک به ترتیب ۴/۳۱ و ۸/۱۱ میلی‌گرم بر گرم بوده است که در مقایسه با میزان استخراجی در پژوهش‌های گذشته که در جدول ۳ آورده شده است مقدار قابل توجه و مناسبی بوده و بیانگر این است که

۱- Surface-Response

۲- Box-Benken Design

۳- Design Expert Software

استخراج و همچنین نمودار نرمال تفاضلات را می‌توان ملاحظه نمود.

بررسی نمودارهای سطح-پاسخ در روش استخراج با حلال

مطابق شکل ۴، با بررسی نمودار زمان-دمای استخراج بر میزان آنتوسیانین، در درصد غلظت حلال ۱۲/۵ و با نسبت حلال به گلبرگ ۳۵ میلی‌لیتر بر گرم، در دماهای ثابت، افزایش زمان تا حدود ۶۰ دقیقه همراه با کاهش بسیار ناچیز آنتوسیانین استخراجی شده است که دلیل آن غالب بودن احتمالی اثرات تخریبی دما بر آنتوسیانین در آن بازه زمانی بوده است و در مدت‌های زمانی بعد از آن تا ۱۲۰ دقیقه، افزایش استخراج آنتوسیانین کلی مشاهده شده است؛ همچنین در تمامی بازه‌های زمانی، افزایش دما تقریباً به صورت خطی موجب کاهش آنتوسیانین کل منومری شده است.

از جمله دلایل این امر می‌توان به پژوهش‌های گیوستی در سال ۲۰۱۱ اشاره کردند که افزایش دما باعث پلیمری شدن آنتوسیانین‌های منومری شده و از تغییر رنگ آن در مقابل تغییر pH جلوگیری می‌کند و بنابراین تعیین میزان آنتوسیانین آن با روش افتراقی ممکن نمی‌باشد (He & Giusti, 2011). با مشاهده و بررسی نمودارهای زمان-دمای استخراج در نقاط ابتدایی (شکل ۵) و نقاط انتهایی (شکل ۶) درصد و نسبت حلال نیز روند مشابهی از آنچه در بالا اشاره شد وجود دارد و تنها در میزان سطوح آنتوسیانین استخراج شده، تفاوت‌ها محسوس می‌باشند.

$$\begin{aligned} \text{Extract} = & 1067.60142 - 0.608307 \times \text{Time} - \\ & 1.24809 \times \text{Solvent} - 11.20720 \times \text{Temperature} - \\ & 30.08944 \times \text{Solvent Ratio} + 0.002401 \times \text{Time} \times \text{Solvent} \\ & + 0.001597 \times \text{Time} \times \text{Temperature} + 0.001104 \times \text{Time} \\ & \times \text{Solvent Ratio} + 0.053701 \times \text{Solvent} \times \text{Temperature} + \\ & 0.207749 \times \text{Solvent} \times \text{Solvent Ratio} + \\ & 0.030369 \times \text{Temperature} \times \text{Solvent} \\ & \text{Ratio} + 0.005567 \times \text{Time}^2 - 0.324020 \times \text{Solvent}^2 \\ & + 0.156732 \times \text{Temperature}^2 + 0.261038 \times \text{Solvent} \\ & \text{Ratio}^2 \end{aligned}$$

که در روابط بالا $Y_{\text{Anthocyanin}}$ و Extract به ترتیب بیانگر میزان آنتوسیانین استخراج شده بر حسب میلی‌گرم سیانیدین‌تری گلیکوزید در هر لیتر عصاره به ازای متغیرهای کد شده و حقیقی می‌باشند. لازم به ذکر است که منظور از کد شده این است که متغیرها مقادیری بین ۱- و ۱+ را بر اساس حد بالا و پایین را می‌پذیرند. بزرگی ضرایب متغیرها صرف نظر از منفی یا مثبت بودنشان، بیانگر اهمیت آن‌ها در تغییرات پاسخ (میزان آنتوسیانین) می‌باشند. همانگونه که در معادله ۴ دیده می‌شود، از بین چهار متغیر مستقل، تنها زمان دارای اثر مثبت و مابقی به تنهایی دارای اثر عکس بر میزان آنتوسیانین استخراج شده دارند. همچنین در بین فاکتورهای مذکور، نسبت حلال و دمای استخراج به ترتیب دارای بالاترین و پایین‌ترین اثر بر راندمان استخراج هستند.

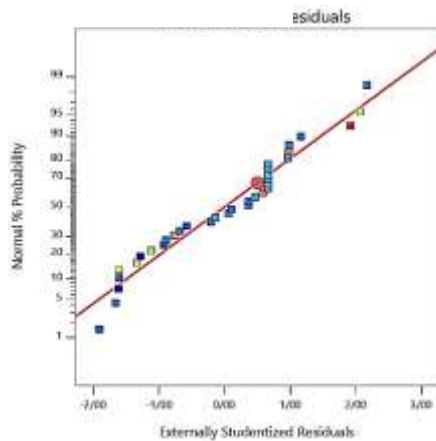
ضریب تبیین^۱ که برابر با ۰/۹۷۷۱ و همچنین ضریب تبیین تنظیم شده^۲ که برابر با ۰/۹۶۰۳ بدست آمدند، بیانگر صحت و درستی مدل با دقت بسیار خوبی هستند؛ چراکه نزدیک بودن این مقادیر به عدد ۱، و بالاتر از ۰/۹ بودن آن‌ها، مطابق پژوهش کوچکی و همکاران (Koocheki et al., 2009) بر تأیید این مفهوم تأکید می‌کند. در شکل ۲ و ۳ به ترتیب میزان آنتوسیانین پیش‌بینی شده در مدل و مقادیر واقعی بدست آمده از طریق

۱- R2

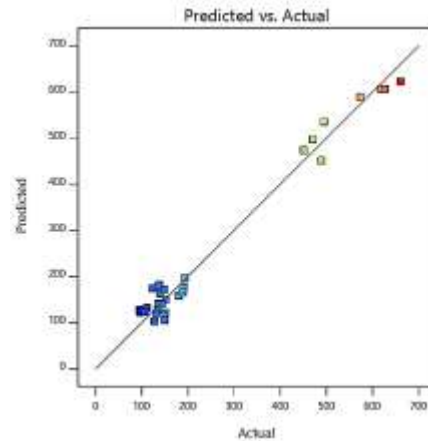
۲- Adjusted R2

جدول ۲- نتایج استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران
Table 2- Saffron petals anthocyanin extraction results

| واحد Unit ردیف Index | فاکتورها Factors | | | | پاسخ Response |
|-------------------------------|---------------------|---|--------------------|---|--|
| | (A) زمان Time | درصد غلظت حلال (B) Solvent concentration | دما Temperature | (D) نسبت حلال به گلبرگ Solvent ratio | میزان استخراج نسبت حلال به گلبرگ Extraction |
| | Minute | % | °C | ml.g ⁻¹ | mg.l ⁻¹ |
| 1 | 60 | 12.5 | 30 | 35 | 188.795 |
| 2 | 60 | 5 | 30 | 35 | 123.723 |
| 3 | 60 | 12.5 | 35 | 35 | 139.547 |
| 4 | 60 | 20 | 30 | 35 | 150.44 |
| 5 | 60 | 12.5 | 25 | 35 | 190.06 |
| 6 | 120 | 12.5 | 30 | 35 | 192.98 |
| 7 | 60 | 12.5 | 30 | 60 | 106.924 |
| 8 | 2 | 20 | 25 | 35 | 136.312 |
| 9 | 2 | 5 | 35 | 10 | 572.846 |
| 10 | 2 | 20 | 25 | 60 | 110.861 |
| 11 | 120 | 5 | 25 | 60 | 95.189 |
| 12 | 2 | 5 | 35 | 60 | 126.991 |
| 13 | 2 | 20 | 35 | 10 | 488.397 |
| 14 | 120 | 20 | 25 | 10 | 470.521 |
| 15 | 120 | 5 | 35 | 60 | 133.985 |
| 16 | 2 | 20 | 35 | 60 | 95.646 |
| 17 | 2 | 12.5 | 30 | 35 | 132.609 |
| 18 | 60 | 12.5 | 30 | 35 | 188.795 |
| 19 | 120 | 20 | 35 | 60 | 151.54 |
| 20 | 120 | 20 | 25 | 60 | 179.75 |
| 21 | 120 | 20 | 35 | 10 | 450.7 |
| 22 | 2 | 5 | 25 | 60 | 149.386 |
| 23 | 60 | 12.5 | 30 | 35 | 188.795 |
| 24 | 60 | 12.5 | 30 | 35 | 188.795 |
| 25 | 120 | 5 | 25 | 10 | 660.15 |
| 26 | 2 | 5 | 25 | 10 | 618.328 |
| 27 | 120 | 5 | 35 | 10 | 626.608 |
| 28 | 60 | 12.5 | 30 | 10 | 494.147 |
| 29 | 60 | 12.5 | 30 | 35 | 188.795 |
| 30 | 60 | 12.5 | 30 | 35 | 188.795 |
| 31 | 40 | 5 | 25 | 35 | 137.253 |
| 32 | 40 | 20 | 30 | 35 | 130.718 |
| 33 | 80 | 12.5 | 30 | 35 | 148.375 |
| 34 | 80 | 20 | 25 | 35 | 142.872 |



شکل ۳- نمودار نرمال تفاضلات
Figure 3- Normal Plot of Residuals.



شکل ۲- نمودار مقادیر پیش بینی شده استخراج برحسب مقادیر واقعی
Figure 2- Predicted values vs. actual values plot.

جدول ۳- میزان آنتوسیانین استخراج شده از ماتریس های گیاهی مختلف

Table 3- Amount of anthocyanin, extracted from different plant matrices

| نام ماتریس Matrix name | میزان آنتوسیانین Amount of anthocyanin (ml.g ⁻¹) | منبع Source |
|-----------------------------------|--|------------------------------|
| ذغال اخته Cranberry | 0.558 | Fulekiet al., 1968 |
| شاه توت Elderberry | 2-10 | Bronnun-Hansen & Flink, 1985 |
| کوبری Cowberry | 1.74 | Andersen, 1987 |
| ذغال اخته کوچک Small cranberry | 0.78 | Andersen, 1987 |
| توت سیاه Blackcurrant | 1.6 | Wilska et al., 1992 |
| چوکبری Chokeberry | 2.9 | Wilska et al., 1992 |
| بیل بری Bilberry | 4.3 | Wilska et al., 1992 |
| گلبرگ زعفران Saffron petals | 6.78 | Hemmati Kakhki et al., 1994 |

جدول ۴- جدول فقدان برازش

Table 4 - Lack of fit

| نوع مدل Model type | انحراف معیار Standard deviation | R ² | R ² تنظیم شده R ² adjusted | R ² پیش بینی شده R ² peredicted | احتمال فقدان برازش با مدل p-Value |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------|---|--|--------------------------------------|
| خطی Linear | 99.60 | 0.7228 | 0.6845 | 0.5945 | 0.0001> |
| اثر متقابل دو فاکتور 2FI | 103.03 | 0.7647 | 0.6624 | 0.0771 | 0.0001> |
| درجه دو Quadratic | 35.35 | 0.9771 | 0.9603 | 0.8911 | 0.0001> |
| درجه سه Cubic | 29.49 | 0.9950 | 0.9724 | | 0.0001> |

جدول ۵- ضرایب رگرسیونی برای میزان آنتوسیانین گلبرگ زعفران در مدل درجه ی دو
Table 5 - Regression coefficients for the amount of saffron petal anthocyanin in the quadratic model

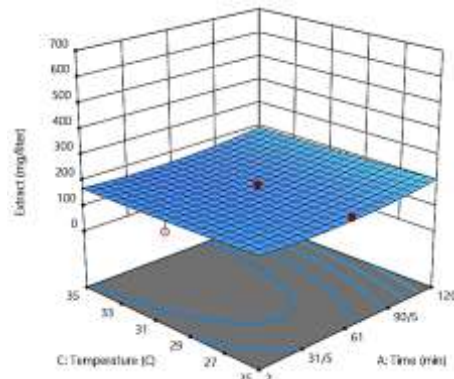
| عبارت‌های مدل Model parameters | ضریب Coefficient | خطای استاندارد Standard error | ارزش F F-Value | ارزش p p-Value |
|---|---------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| ثابت Intercept | 166.21 | 10.33 | 57.98 | <0.0001 |
| A- زمان Time | 11.06 | 8.43 | 1.72 | 0.2053 |
| B- درصد غلظت حلال Solvent percentage | -26.56 | 7.96 | 11.14 | 0.0035 |
| C- دما Temperature | -6.57 | 8.36 | 0.6176 | 0.4416 |
| D- نسبت حلال Solvent ratio | -206.04 | 8.84 | 543.31 | <0.0001 |
| AB | 1.06 | 8.95 | 0.0141 | 0.9067 |
| AC | 0.4710 | 9.02 | 0.0027 | 0.9589 |
| AD | 1.63 | 9.44 | 0.0298 | 0.8648 |
| BC | -2.01 | 8.55 | 0.0554 | 0.8164 |
| BD | 38.95 | 9.44 | 17.02 | 0.0006 |
| CD | 3.80 | 9.44 | 0.1616 | 0.6922 |
| A ² | 19.38 | 19.89 | 0.9492 | 0.3422 |
| B ² | -18.23 | 18.44 | 0.9771 | 0.3353 |
| C ² | 3.92 | 19.30 | 0.0412 | 0.8412 |
| D ² | 163.15 | 18.93 | 74.25 | <0.0001 |

و در نتیجه افزایش میزان استخراج به ازای هر گرم گلبرگ خشک خواهد شد اما در این پژوهش، در نسبت های بالاتر حلال به گلبرگ به دلیل کاهش نسبت وزن ماده اولیه در حجم حلال و کم شدن غلظت، از میزان آنتوسیانین استخراج شده کاسته شده است. یکی از فاکتورهای مهم در هنگام بررسی تأثیر نسبت حلال، در نظر گرفتن تغییرات pH می باشد. پایین بودن مقدار pH مطابق گفته اکثر منابع از جمله پژوهش هی و گیوستی در سال 2011، موجب ثبات و پایداری آنتوسیانین موجود در بافت گیاهی و رنگ قرمز آن می شود (He & Giusti, 2011).

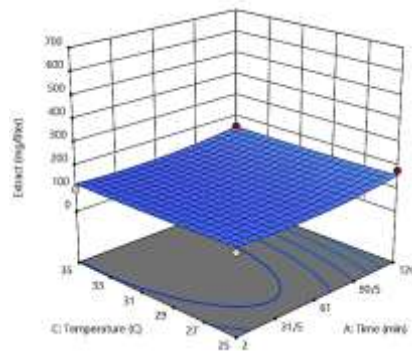
بنابراین استفاده از نسبت های حلال پایین که موجب بالا رفتن pH محلول می شود، با این که از لحاظ آنتوسیانین غنی می باشد اما سرعت تخریب آنتوسیانین بالاتری دارد. از طرفی دیگر با در نظر گرفتن این نکته که آنتوسیانین ها در نهایت با بریکس^۱ بالاتری (حدوداً ۶۰٪) قرار است.

در بررسی نمودار دما-نسبت حلال در زمان استخراج ۶۰ دقیقه و با درصد غلظت حلال ۱۲/۵ (شکل ۷)، حداکثر میزان آنتوسیانین در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در نسبت حلال به گلبرگ ۱۰ میلی لیتر بر گرم حاصل شده است. البته این نکته قابل توجه است که در نسبت های حلال به گلبرگ ثابت، افزایش دما تا ۳۵ درجه سانتی گراد، تأثیر چندانی بر آنتوسیانین استخراج شده ندارد؛

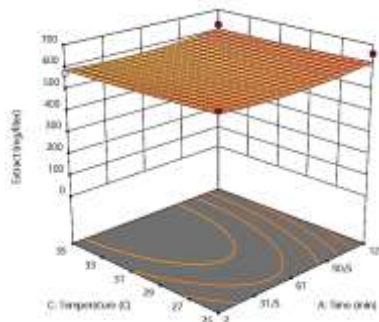
اما در یک دمای ثابت، کاهش نسبت حلال به گلبرگ از ۶۰ تا ۱۰ میلی لیتر بر گرم، در افزایش میزان آنتوسیانین استخراج شده تأثیر بسزایی دارد. به عنوان مثال، در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد، با کاهش نسبت حلال از ۶۰ به ۱۰ میلی لیتر بر گرم، حدود ۸۰ درصد افزایش در میزان آنتوسیانین استخراجی مشاهده گردید. در تمامی حالات (درصد غلظت حلال و زمان استخراج ثابت) این روند مشاهده گردیده است. این نکته شایان ذکر است که البته نسبت بالاتر حلال موجب اختلاف غلظت بیشتر، افزایش ضریب انتشار، افزایش سطح تماس مایع با بافت گیاهی



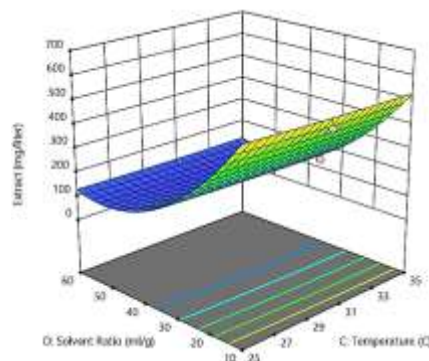
شکل ۴- نمودار سطح-پاسخ آنتوسیانین در مقابل دو متغیر دما و زمان با درصد غلظت حلال ۱۲/۵٪ و نسبت حلال ۳۵ میلی لیتر بر گرم
 Figure 4- Surface-response plot of anthocyanin content against two variables of temperature and time with 12.5% solvent percentage and 35 ml.g⁻¹ solvent ratio.



شکل ۵- نمودار سطح-پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر دما و زمان با درصد حلال ۲۰٪ و نسبت حلال ۶۰ میلی لیتر بر گرم
 Figure 5 - Surface-response plot of anthocyanin content against two variables of temperature and time with 20% solvent percentage and 60 ml.g⁻¹ solvent ratio.



شکل ۶- نمودار سطح-پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر دما و زمان با درصد حلال ۵٪ و نسبت حلال ۱۰ میلی لیتر بر گرم
 Figure 6- Surface-response diagram of anthocyanin content against two variables of temperature and time with 5% solvent percentage and 10 ml.g⁻¹ solvent ratio.

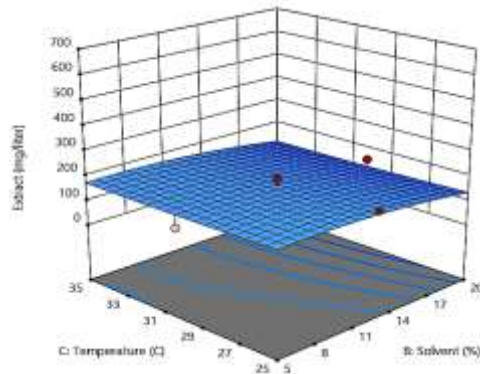


شکل ۷- نمودار سطح- پاسخ آنتوسیانین در مقابل دو متغیر دما و نسبت حلال با درصد غلظت حلال ۱۲/۵٪ و زمان استخراج ۶۰ دقیقه
 Figure 7- Surface-response plot of anthocyanin content against two variables of temperature and solvent percentage 12.5% and extraction time 60 minutes.

از دما بوده است و این روند کاهشی در نسبت حلال‌های پایین تر نمایان تر می‌باشد. در یک پژوهش که کاکاسه و ماتزا در سال 2003 بر روی استخراج آنتوسیانین کشمش سیاه انجام دادند، مشاهده کردند که افزایش درصد غلظت حلال (اتانول) از ۲۰ به ۸۰ دمای بحرانی تخریب آنتوسیانین را از ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ۳۵ درجه سانتی‌گراد افزایش داده و در هر دما با افزایش درصد اتانول تا ۶۰، راندمان ابتدا افزایش و سپس کاهش داشته است (Cacace & Mazza, 2003). در پژوهش مهدوی خزاعی و همکاران (Mahdavee Khazaei et al., 2014)، آنها با بررسی اثر دما و درصد غلظت حلال بر استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران نیز به نتیجه مشابهی با این پژوهش دست یافتند و روند کاهشی آنتوسیانین استخراج شده را با افزایش درصد غلظت حلال (اتانول) و دما مشاهده نمودند. علاوه بر این، واتایی و همکاران در سال 2008 نیز گزارش دادند که روش‌های استخراج با حلال‌های است و نیبر پایه آبی که در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شوند نتایج به مراتب بهتری نسبت به آنچه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود بدست می‌دهد که مؤید نتایج بدست آمده از این شکل می‌باشد (Vatai et al., 2008).

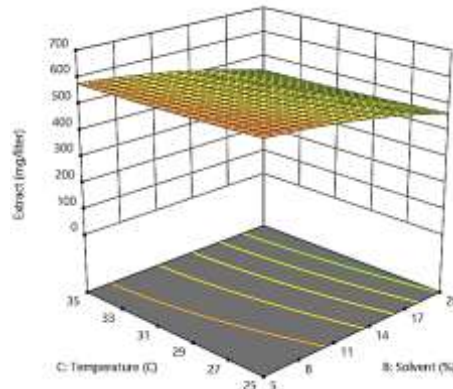
مورد استفاده در صنایع قرار بگیرند و پس از فرآیند استخراج نیاز به تغلیظ دارند، این امر ناچاراً محلول را با افزایش pH مواجه خواهد کرد؛ بنابراین با تمام این تفاسیر میزان آنتوسیانین بیشتر موجود در محلول استخراج شده که با نسبت حلال‌های کمتر حاصل می‌شوند در اولویت قرار می‌گیرد.

اثر متقابل متغیرهای دما و درصد اسیدسیتریک بر میزان استخراج در شکل‌های ۸ و ۹ در نقاط میانی و حداقل نسبت حلال نشان داده شده است. افزایش نسبت حلال از ۳۵ تا ۶۰ میلی‌لیتر بر گرم، با اینکه با کاهش آنتوسیانین استحصال همراه است، اما تفاوت ناچیزی با یکدیگر دارند در حالی که با کاهش نسبت حلال از ۳۵ به ۱۰ میلی‌لیتر بر گرم، تفاوت سطح آنتوسیانین استخراج شده قابل توجه بود. بنابراین از آوردن نمودار دما-درصد غلظت حلال در نسبت حلال حداکثر (۶۰ میلی‌لیتر بر گرم) خودداری شده است. به عنوان مثال، در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و درصد غلظت حلال ۵، با کاهش نسبت حلال از ۳۵ به ۱۰ میلی‌لیتر بر گرم، میزان آنتوسیانین استحصال حدود ۷۲ درصد افزایش داشته است. به طور کلی، همان‌طور که در نمودارها مشخص است، به طور کلی افزایش درصد اسید سیتریک و دما، میزان آنتوسیانین عصاره را در بازه زمانی ۶۰ دقیقه به طور پیوسته کاهش داده است؛ البته تأثیر درصد غلظت حلال در کاهش میزان آنتوسیانین استخراج شده، به مراتب بیشتر



شکل ۸- نمودار سطح- پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر دما و درصد غلظت حلال با نسبت حلال ۳۵ میلی لیتر بر گرم و زمان استخراج ۶۰ دقیقه

Figure 8- Surface-response plot of anthocyanin content against two variables of temperature and solvent percentage with solvent ratio of 35 ml.g⁻¹ and extraction time 60 minutes.

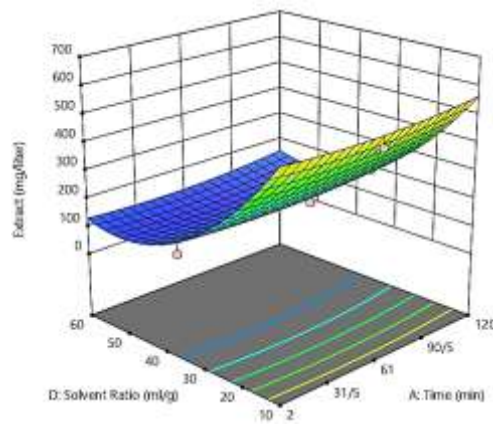


شکل ۹- نمودار سطح- پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر دما و درصد غلظت حلال با نسبت حلال ۱۰ میلی لیتر بر گرم و زمان استخراج ۶۰ دقیقه

Figure 9 - Surface-response plot of anthocyanin content against two variables of temperature and solvent percentage with solvent ratio of 10 ml.g⁻¹ and extraction time 60 minutes.

مقایسه با بازه های زمانی ۸ ساعت و بیشتر رخ نخواهد داد و همواره در این بازه زمانی افزایش میزان آنتوسیانین استخراج شده صورت می گیرد که همین مورد می تواند یکی از مزیت های استخراج در بازه های زمانی پایین باشد. کاکاسه و ماتزا در پژوهش خود در سال 2003 نیز به این نکته اشاره کردند که در زمان کوتاه تر استخراج، با کم رنگ شدن اثر متغیر زمان بر استخراج، اثر مستقیم نسبت حلال بر میزان آنتوسیانین استخراج شده نمایان تر می باشد (Cacace & Mazza, 2003).

با بررسی نمودار زمان-نسبت حلال (شکل ۱۰) بر میزان آنتوسیانین منومری استخراج شده ملاحظه می گردد که بالاترین راندمان استخراج، در بیشترین زمان (۱۲۰ دقیقه) با کمترین نسبت حلال (۱۰ میلی لیتر بر گرم) حاصل شده است. نتایج حاصل از این پژوهش با پژوهش مهدوی خزاعی و همکاران در سال ۱۳۹۳ مطابقت مطلوبی دارد (Mahdavee Khazaei et al., 2014). مشخصاً با این مقایسه که در این پژوهش بازه های زمانی پایین (تا ۲ ساعت) برای استخراج انتخاب شده اند و در این بازه اثرات زمانی محسوس نیستند، کاهش آنتوسیانین در



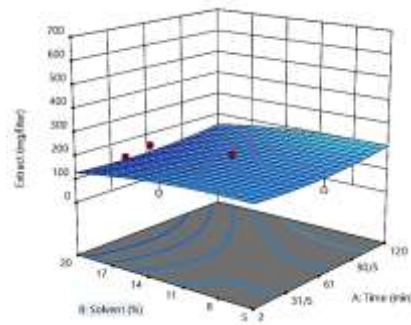
شکل ۱۰- نمودار سطح-پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر زمان و نسبت حلال با درصد غلظت حلال ۱۲/۵ و دمای استخراج ۳۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 10 - Surface-response plot of anthocyanin content against two variables of time and solvent ratio with solvent percentage of 12.5 and extraction temperature of 30 °C.

مستقل با توجه به اثر تخریبی و هیدرولیزی که بر روی آنتوسیانین استخراج شده می‌گذارد مشهود می‌باشند؛ هرچند با توجه به بازه انتخاب شده، تأثیرات دمایی بسیار ناچیز هستند. با مقایسه این پژوهش با مورد مشابه مهدوی خزاعی و همکاران (Mahdavee Khazaei et al., 2014)، به طور کلی می‌توان به نزدیکی روندهای انجام آزمایش و نتایج پی برد. البته تفاوت‌های موجود، به علت تفاوت حلال قابل استدلال و منطقی می‌باشد.

با بررسی اثر متقابل زمان-درصد غلظت حلال در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با نسبت حلال به گلبرگ ۳۵ میلی‌لیتر بر گرم مطابق با شکل ۱۱ دریافت می‌شود که در زمان استخراج ثابت، ابتدا با افزایش درصد غلظت حلال تا حدود ۱۱ درصد، به اندازه ناچیزی با افزایش میزان آنتوسیانین استخراجی مواجه شده و در درصد‌های بعد از آن تا ۲۰٪، میزان آنتوسیانین استخراج شده کاهش یافته است. از طرف دیگر در درصد غلظت حلال‌های ثابت اسیدسیتریک، ابتدا تا حدود زمان استخراج ۶۰ دقیقه، با کاهش آنتوسیانین استخراج شده مواجه شده و در زمان‌های بعد از آن تا ۱۲۰ دقیقه میزان آنتوسیانین استخراج شده افزایش محدودی را داشته است. این روندها، در نسبت‌های حلال بالاتر یعنی تا ۶۰ میلی‌لیتر بر گرم، به طور قابل ملاحظه‌تری مشاهده می‌شود و در نسبت حلال‌های پایین، یعنی از ۳۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر بر گرم، یکنواخت‌تر شده و با روندهای افزایش و سپس کاهش در زمان ثابت مواجه نمی‌شود؛ به طوری که در یک زمان ثابت، با افزایش درصد غلظت حلال، میزان آنتوسیانین استخراج شده به طور پیوسته کاهش می‌یابد.

با توجه به نمودارهای فوق و خروجی داده‌های این طراحی آزمایش، افزایش دو پارامتر دما و درصد غلظت حلال به طور



شکل ۱۱- نمودار سطح- پاسخ میزان آنتوسیانین در مقابل دو متغیر زمان و درصد غلظت حلال با نسبت حلال ۳۵ میلی لیتر بر گرم و دمای استخراج ۳۰ درجه سانتی گراد

Figure 11 - Surface-response plot of anthocyanin content against two variables of time and percentage of solvent with solvent ratio of 35 ml.g⁻¹ and extraction temperature of 30 ° C.

جدول ۶- پیش بینی شرایط بهینه دستیابی به بالاترین راندمان استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران

Table 6 - Predicting the optimal conditions for achieving the highest anthocyanin extraction efficiency of saffron petals

| پارامترهای بهینه سازی Optimization parameters | حد پایین Low limit | حد بالا Up limit | مقدار بهینه Optimum |
|--|-----------------------|---------------------|------------------------|
| نسبت حلال به گلبرگ Solvent ratio (ml.g ⁻¹) | 10 | 60 | 10 |
| درصد غلظت حلال اسیدسیتریک Solvent percentage (weight.volume ⁻¹) | 5 | 20 | 5.04 |
| دمای استخراج Extraction temperature (°C) | 25 | 35 | 25 |
| زمان استخراج Extraction time (Minute) | 2 | 180 | 179.555 |
| میزان آنتوسیانین Anthocyanin (mg.l ⁻¹) | 95.189 | 690 | 688.944 |

آنتوسیانین استخراجی، حد بالای زمان استخراج ۱۸۰ دقیقه در نظر گرفته شد. از میان راه حل های ارائه شده توسط قسمت بهینه سازی نرم افزار دیزاین اکسپرت^۱، با در نظر گرفتن مطلوبیت^۲ بالا که برابر با ۰/۹۹۸ حاصل شد، شرایط بهینه زیر انتخاب گردید که عبارتند از: زمان استخراج ۱۷۹/۵۵۵ دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، نسبت حلال به گلبرگ ۱۰ میلی لیتر بر گرم و درصد غلظت حلال اسید سیتریک ۵/۰۴٪. در این شرایط، مقدار آنتوسیانین استحصالی پیش بینی شده توسط مدل برابر با ۶۸۸/۹۴۴ میلی گرم بر لیتر به دست آمد.

بهینه سازی شرایط استخراج

با توجه به جدول ۶، شرایط بهینه به منظور بیشترین میزان استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران در عصاره، مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تعیین حدود متغیرها، مصرف کمتر حلال و درصد پایین تر اسیدسیتریک به عنوان متغیرهای محدود کننده مدنظر قرار گرفتند. حد پایین آنتوسیانین استخراج شده برابر با ۹۵/۱۸۹ میلی گرم بر لیتر و حد بالای آن ۶۹۰ میلی گرم بر لیتر یعنی به ترتیب کمترین و بیشترین میزان استخراج شده مرتبط با این پژوهش تعیین گردیدند. برای سایر پارامترها، حدود بالا و پایین داده های آزمایشی موجود در جدول ۲ مورد لحاظ قرار گرفتند؛ تنها برای پارامتر زمان استخراج و به منظور افزایش

۱- Design Expert

۲- Desirability

نتیجه‌گیری

در این پژوهش که جزو نخستین پژوهش‌ها در زمینه بررسی اثر حلال اسیدسیتریک به عنوان یک حلال در دسترس و تأییدشده در صنایع غذایی بر روی استخراج آنتوسیانین از یک بافت گیاهی می‌باشد، چهار متغیر آزمایشی درصد غلظت حلال، نسبت حلال به گلبرگ زعفران، دما و زمان تعریف شدند. پارامترهای آزمایش از جمله درصد غلظت حلال و به ویژه نسبت حلال به لحاظ آماری دارای اثر مستقل و معناداری بر استخراج آنتوسیانین بودند و زمان و دما در بازه‌های تعریف شده، اثر معنادار کمتری از خود بر جای گذاشتند. از مدل درجه دوم با دقت بسیار مناسبی برای پیش‌بینی میزان آنتوسیانین استخراجی استفاده گردید. کاهش نسبت حلال به گلبرگ، فارغ از در نظر گرفتن سایر متغیرها، همواره باعث افزایش آنتوسیانین استخراج شده در محلول گردیده است. همچنین به طور کلی، افزایش درصد غلظت حلال در بازه در نظر گرفته شده، باعث کاهش آنتوسیانین استخراج شده گردیده است. با افزایش زمان از ۲ تا ۱۲۰ دقیقه، هرچند با شیب تغییرات اندک، همواره افزایش میزان

منابع

- Amelia, F., Galih, N.A., Arini, M., Alia, N.F., Sisca, U., and Mimiek M. 2013. Extraction and stability test of anthocyanin from Buni fruits (*Antidesma bunius* L.) as an alternatsive natural and safe food colorants. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences* 1: 49-53.
- Andersen, M. 1987. Anthocyanins in fruits of *Vaccinium uliginosum* L. (Bog Whortleberry). *Journal of Food Science* 52 (3): 665-666.
- Azghandi Fardaghi, A., Es-haghi, A., Fezy, J., and Lakshmipathy, R. 2021. Antioxidant capacity and chemical composition of different parts of saffron flowers. *Journal of Food and Bioprocess Engineering* 4 (1): 69-74.
- Bronnum-Hansen, K., and Flink, J.M. 1985. Anthocyanin Colourants From elderberry (*Sambucus nigra* L.) process considerations for production of a freeza dried product. *Journal of Food Technology* 20: 713-723.
- Cacace, J.E., and Mazza, G. 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* 68: 240-248.
- Carvalho, F.B., Gutierrez, J.M., Bohnert, C., Zago, A.M., Abdalla, F.H., Vieira, J.M., Palma, H.E., Oliveira, S.M., Spanevello, R.M., Duarte, M.M., Lopes, S.T.A., Aiello, G., Amaral, M.G., Pippi, N.L., and Andrade, C.M. 2015.

آنتوسیانین تولیدی رخ داد و به طور کلی افزایش دما تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز تأثیر منفی بر روی آنتوسیانین استخراج شده گذاشت. مطابق بهینه‌سازی، با در نظر گرفتن بیشترین آنتوسیانین استخراج شده به عنوان پارامتر خروجی، مصرف حداقل حلال و درصد پایین‌تر اسیدسیتریک، زمان استخراج ۱۷۹/۵۵۵ دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، نسبت حلال به گلبرگ ۱۰ میلی‌لیتر بر گرم و درصد غلظت حلال ۵/۰۴ با خروجی ۶۸۸/۹۴۴ میلی‌گرم آنتوسیانین منومری بر لیتر به عنوان شرایط بهینه استخراج بدست آمد.

با بررسی نتایج حاصل شده و مقایسه با سایر منابع سرشار از آنتوسیانین، دریافت می‌شود که گلبرگ زعفران منبع بسیار غنی از آنتوسیانین بوده که با استفاده از حلال اسیدسیتریک و زمان کم استخراج نیز، خروجی بسیار مناسبی از خود برجای گذاشته است؛ قیمت بسیار پایین گلبرگ زعفران به عنوان ماده اولیه و به خاطر دورریز بودن آن نیز می‌تواند دلیل دیگری بر استفاده از این منبع بالقوه آنتوسیانین برای تولید و استفاده در صنایع مختلف از جمله غذایی و دارویی باشد.

- Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26: 378-390.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.d.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., and Galán-Vidal, C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113: 859-871.
- Fuleki, T., and Francis, F.J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. *Journal of Food Science* 33: 266-274.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., and Scaccini, C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 361-367.
- He, J., and Giusti, M.M. 2011. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables—A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218: 7914-7922.
- Hemmati Kakhki, A., Hoseini, K., and Rahimi, S. 1994. Search and extraction of Khorasan saffron petal anthocyanin and study of its stability in a model beverage. MSC Thesis, Department of Agriculture and Food Industries of Khorasan Research Institute, Mashhad.
- Kafi, M. 2006. *Saffron (Crocus sativus) Production and Processing*: Science Publishers, New York.
- Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A., and Gordon, M.H. 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4016-4021.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., and Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Koocheki, A., Taherian, A.R., Razavi, S.M.A., and 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.
- Lee, J., Rennaker, C., and Wrolstad, R.E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 110 (3): 782-786.
- Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S.M., Ghorbani, M., and Hemmati Kakhki, A. 2014. Optimization of anthocyanin extraction in Saffron's petal with response surface methodology: JRIFST 3: 37-50.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., and Clydesdale, F.M. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science* 45: 1099-1100.
- Ni, P.B.T.D., Ni, M.A.S.S., and I, G.P.M. 2020. Extraction and stability of natural dyes from the skin of red dragon fruit. *Sustainable Environment Agricultural Science* 4: 130-141.
- Parabavathy, N., Shalini, S., Balasundaraprabhu, R., Dhayalan Velauthapillai., Prasanna, S., Walke, P., and Muthukumarasamy, N. 2017. Effect of solvents in the extraction and stability of anthocyanin from the petals of *Caesalpinia pulcherrima* for natural dye sensitized solar cell applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 28: 9882-9892.
- Tedesco, I., Luigi Russo, G., Nazzaro, F., Russo, M., and Palumbo, R. 2001. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 12: 505-511.
- Vatai, T., Škerget, M., Knez, Ž., Kareth, S., Wehowski, M., and Weidner, E. 2008. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *The Journal of Supercritical Fluids* 45: 32-36.

Vrhovsek, U., Masuero, D., Palmieri, L., and Mattivi, F. 2012. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *Journal of Food*

Composition and Analysis 25: 9-16.
Wilska J., Jeszka, J., and Zajac, K. 1991. Anthocyanin as natural food colourants. *I. F. I.* 3: 10-15