



## استخراج ترکیبات موثره گلبرگ زعفران به کمک امواج فراصوت و بهینه‌سازی شرایط استخراج آن

زهرا احمدیان کوچکسرایبی<sup>۱</sup>، راضیه نیازمند<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه فراوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد  
۲. استادیار، گروه شیمی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۶، تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۳)

### چکیده

گیاه زعفران از جمله گیاهانی است که بخش‌های مختلف آن از دیر باز در صنعت غذا و طب سنتی استفاده می‌شود. گلبرگ زعفران به‌عنوان محصول جانبی فراوری زعفران حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است، اما هم‌چنان اطلاعات کمی در مورد نحوه استخراج این ترکیب‌ها از آن به شیوه‌های گوناگون وجود دارد. استخراج به کمک فراصوت روشی سریع و موثر برای استخراج ترکیبات موثره گیاهی است که در مقیاس صنعتی و آزمایشگاهی قابل اجرا می‌باشد. در این پژوهش از روش سطح پاسخ، طرح باکس‌بنکن، به‌منظور بررسی تأثیر دمای استخراج، ۲۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج، ۵-۱۵ دقیقه و شدت صوت، ۲۰-۱۰۰ 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 ۱۵ دقیقه، دمای استخراج ۴۳ درجه سانتی‌گراد و شدت صوت ۱۰۰ درصد باشد، بیش‌ترین بازده استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌گردد. تحت این شرایط میزان ترکیبات پلی‌فنولی ۱۳۸۰ میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک، فلاونوئید ۱۴۴ میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک، آنتوسیانین ۱۲۰ میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک، درصد به دام اندازه‌ی رادیکال آزاد DPPH، ۷۳ درصد و توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن، ۳/۸ میلی‌مولار به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان، پلی‌فنول، گلبرگ زعفران، طرح باکس‌بنکن.

## 1- مقدمه

فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی در بدن انسان ممکن است منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد گردد. تولید بیش از حد آن‌ها می‌تواند باعث آسیب اکسایشی مولکول‌های زیستی یعنی پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA و در نهایت منجر به بیماری‌های مزمن از جمله آترواسکلروز، دیابت، سرطان و پیری، در انسان گردد.

طی سال‌های اخیر توجه به یافتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی که توانایی جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مواد غذایی را داشته باشند، معطوف شده است [1]. ترکیبات فنولی موجود در برخی گیاهان دارای ویژگی‌های فیزیولوژیکی از جمله ضد التهاب<sup>1</sup>، ضد آلرژی<sup>2</sup>، ضد میکروبی<sup>3</sup> و آنتی‌اکسیدانی<sup>4</sup> می‌باشند [2]. افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)<sup>5</sup>، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)<sup>6</sup>، ترسیو بوتیل هیدروکینون (TBHQ)<sup>7</sup> می‌تواند اکسایش لیپیدها را در مواد غذایی کنترل نماید، ولی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به دلیل سمیت و خطراتی که برای سلامتی دارند، محدود شده است. از این رو، تلاش جهت یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه 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 [3].

زعفران با نام علمی *Crocus sativus L.* متعلق به خانواده زنبقی‌ها (Iridaceae) گیاهی علفی و چند ساله است که در برخی مناطق جهان به‌ویژه ایران کشت می‌شود. از گل‌های این گیاه، کلاله‌های خشک به‌دست می‌آید که به‌عنوان گرانبهاترین ادویه جهان شناخته می‌شود [4]. ایران بزرگ‌ترین تولیدکننده زعفران به‌شمار می‌آید و بالغ بر 90 درصد زعفران دنیا در ایران تولید می‌شود. استان خراسان بزرگ به‌ویژه خراسان جنوبی و خراسان رضوی مناطق عمده کشت زعفران را تشکیل

می‌دهند. براساس آمار، در سال زراعی 94-1393، بیش از 350 تن زعفران خشک تولید شده است. از هر 78 کیلوگرم گل به‌طور معمول 1 کیلوگرم زعفران دسته‌ای (کلاله همراه با خامه) حاصل می‌شود. از این رو، سالانه بیش از 3000 تن گلبرگ زعفران خشک به‌عنوان محصول جانبی تولید شده که به‌دلیل غیرقابل استفاده بودن آن تاکنون، دور ریخته می‌شده است [5]. زعفران در طب سنتی دارای خواص دارویی متعددی است که عمده تحقیقات دارویی روی کلاله زعفران انجام شده است. علاوه بر این شواهد گوناگونی مبنی بر وجود ترکیباتی با اثرات دارویی در گلبرگ زعفران وجود دارد. در تحقیقات متعدد ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی [6]، ضدافسردگی [7] و اثر بر فشار خون [8] عصاره گلبرگ زعفران مورد بررسی قرار گرفته است. گلبرگ زعفران حاوی آنتی‌اکسیدان‌های قوی مانند فلاونوئیدها می‌باشد که به‌صورت متصل به آلومین، در سرم خون حمل گردیده و با این پروتئین اثرات متقابل دارد. از طرف دیگر تأثیرات فلاونوئیدها در کاهش کلسترول [9] و ویژگی‌های ضدرادیکالی [10] آن در تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است.

در رابطه با ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران پژوهش‌های اندکی صورت گرفته است. در پژوهشی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات عصاره گلبرگ زعفران با استفاده از روش LC-DAD-MS (ESI<sup>+</sup>)<sup>1</sup> بررسی 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. [11]. در پژوهش دیگری ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پیاز، گلبرگ و برگ‌های زعفران مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل از پژوهش نشان داد، گلبرگ‌ها و برگ‌های گیاه زعفران می‌توانند جهت استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان، مورد استفاده قرار گیرند [12]. مطالعات پیشین، به‌کارگیری گل‌های زعفران را در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی به سبب داشتن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و در درمان برخی بیماری‌ها توصیه نمودند [13-14].

اهمیت آنتی‌اکسیدان‌ها در صنایع مختلف از جمله صنعت غذا

1. Anti-inflammatory
2. Anti-allergic
3. Anti-microbial
4. Anti-oxidant
5. Butylated Hydroxyanisole
6. Butylated Hydroxytoluene
7. tert-Butylhydroquinone

1. Liquid Chromatography-Diode-Array Detection-Mass Spectrometry (Electron-Spray Ionization)

نیتريت سدیم، کلرید آلومینیوم، هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان و 1 و 1 دی فنیل-2-پیکریل هیدرازیل<sup>1</sup> و 2 و 4 و 6-تریس(2-پیریدیل)-اس-تریازین<sup>2</sup> از شرکت سیگما تهیه گردید.

## 2-2- روش‌ها

### 2-2-1- استخراج با کمک فراصوت

به منظور استخراج عصاره گلبرگ زعفران مقدار مشخصی از پودر گلبرگ با آب مخلوط (نسبت گلبرگ به آب: 1 به 30 وزنی/حجمی) و جهت استخراج بهتر از روش فراصوت استفاده گردید. شرایط هر آزمون شامل دما، زمان و شدت صوت بر اساس سطوح متغیرهای پیش‌بینی شده در طرح باکس‌بنکن<sup>3</sup> مطابق جدول (1) در نظر گرفته شد. در نهایت پس از گذشت زمان استخراج، عصاره از صاف کردن نمونه با کاغذ صافی واتمن شماره 1 و به کمک خلأ به دست آمد. عصاره‌های به دست آمده در بطری‌های شیشه‌ای در دمای 20- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون نگهداری گردید.

### 2-2-2- اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی

محتوای فنولی کل بر اساس روش فولین-سیوکالچو تعیین گردید [17]. 40 میکرولیتر از عصاره با 3/16 میلی‌لیتر از آب دیونیزه و 200 میکرولیتر از معرف فولین-سیوکالچو مخلوط و به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس 600 میکرولیتر کربنات سدیم 25 درصد به مخلوط اضافه و در نهایت پس از 90 دقیقه ماندن در دمای اتاق، جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (دو پرتویی فرابنفش-مرئی Shimadzu، مدل UV-160A، ساخت ژاپن) در طول موج 765 نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش از اسید گالیک به میزان 100-950 ppm، به‌عنوان 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 اسید-گالیک / صد گرم گلبرگ خشک گزارش گردید.

### 2-2-3- اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدی

سنجش فلاونوئیدها بر اساس آزمون رنگ‌سنجی صورت

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
2. 2,4,6-tripyridyltriazine (TPTZ)
3. Box-Behnken

سبب شده تا تحقیقات بر روش‌های استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها با هدف افزایش بازده استخراج و بهبود کیفیت (فعالیت آنتی‌اکسیدانی) گسترش یابند. روش‌های استخراج جدید مانند استخراج به کمک امواج فراصوت روشی سریع و موثر برای استخراج ترکیب‌های موثره از بافت گیاهی است و نسبت به سایر روش‌های استخراج مانند استخراج با امواج میکروویو هزینه بری کم‌تر و کاربردی ساده‌تر دارد [15]. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون مربوط می‌شود که در اثر آن حباب‌های بسیار ریزی در مایع تشکیل شده، سپس به سرعت رشد کرده و منفجر می‌شوند. اثرات مکانیکی امواج فراصوت و پدیده کاویتاسیون ایجاد شده در اثر این امواج، سبب افزایش نفوذ حلال به داخل سلول‌های گیاهی، افزایش انتقال جرم و به دنبال آن افزایش بازدهی استخراج در دماهای پایین‌تر می‌گردد. همچنین استفاده از این امواج در استخراج ترکیبات مختلف از بافت گیاهی، سرعت فرایند استخراج را افزایش داده و مصرف حلال را کاهش می‌دهد [16]. از آن‌جا که مطالعات کمی روی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گلبرگ زعفران صورت گرفته است، بنابراین پژوهش حاضر با هدف تعیین شرایط بهینه استخراج عصاره آنتی‌اکسیدانی از گلبرگ زعفران به‌عنوان یک منبع ارزان قیمت با استفاده از فناوری امواج فراصوت، طراحی گردید.

## 2- مواد و روش‌ها

### 2-1- مواد

گلبرگ‌های زعفران از مزرعه‌ای در منطقه تربت حیدریه استان خراسان رضوی تأمین گردید. گلبرگ‌ها به‌منظور 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 3/5 درصد) توسط آسیاب آزمایشگاهی (IKA، مدل A11 basic Analytical mill، ساخت آلمان) پودر و اندازه ذرات آن با استفاده از الک با مش 50 میکرومتر تنظیم و تا زمان انجام آزمون‌ها در فریزر با دمای 18- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سایر مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل اتانول 96٪، معرف فولین-سیوکالچو<sup>1</sup>، اسید گالیک، کربنات-سدیم، استات سدیم، کلرید پتاسیم، 1. Folin-Ciocalteu reagent

گرفت [18]. بدین ترتیب که ابتدا 0/5 میلی‌لیتر از عصاره با 2/5 میلی‌لیتر آب و 150 میکرولیتر از محلول 5٪ نیتريت سدیم (NaNO<sub>2</sub>) مخلوط و به مدت 6 دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس 300 میکرولیتر از محلول 10٪ کلرید آلومینیوم (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) به مخلوط اضافه و پس از 5 دقیقه، 1 میلی‌لیتر از محلول سود 1 مولار و 550 میکرولیتر آب به مخلوط اضافه گردید. در نهایت پس از حدود 5 دقیقه، جذب آن در طول موج 430 نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش از کوئرتستین (80-10 میلی گرم در لیتر) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج بر اساس میلی‌گرم کوئرتستین / صد گرم گلبرگ خشک بیان گردید.

#### 2-2-5- اندازه‌گیری قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها طبق روش Von Gadow و همکاران [20] تعیین شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول اتانولی 0/1 میلی‌مولار DPPH تهیه گردید. سپس 200 میکرولیتر از عصاره (غلظت 90 میلی‌گرم/لیتر فنول) با 3 میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط و پس از 30 دقیقه ماندن در تاریکی، جذب آن در طول موج 517 نانومتر تعیین گردید. درصد رادیکال آزاد DPPH مهار شده (% RSA) با استفاده از معادله (4) محاسبه گردید:

$$\% \text{ RSA} = (A_{\text{cont}} - A_{\text{sample}}) \times 100 / A_{\text{cont}} \quad (4)$$

A<sub>cont</sub> مقدار جذب نمونه کنترل و A<sub>sample</sub> مقدار جذب عصاره می‌باشد.

#### 2-2-6- آزمون قدرت کاهندگی آهن<sup>1</sup>

آزمون قدرت آنتی‌اکسیدانی/ کاهندگی آهن طبق روش Strain و Benzie [21] با اندکی تغییرات انجام شد. واکنشگر FRAP از 2/5 میلی‌لیتر محلول 10 میلی‌مولار TPTZ، 2/5 میلی‌لیتر از محلول 20 میلی‌مولار کلرید آهن و 25 میلی‌لیتر از محلول 300 میلی‌مولار استات بافر (pH=3/6) تهیه و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه نگهداری گردید. 3 میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده FRAP با 150 میکرولیتر از عصاره مخلوط و پس از 30 دقیقه ماندن در تاریکی، جذب آن در طول موج 593 نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول آبی سولفات آهن(II) (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) جهت تهیه نمودار کالیبراسیون استفاده گردید.

#### 2-2-7- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به‌منظور بررسی اثرات متغیرهای فرایند استخراج شامل دما و زمان استخراج و نیز توان فراصوت با حدود مشخص بالا و پایین بر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از گلبرگ زعفران، از طرح باکس‌بنکن استفاده شد. این

1. Ferric Reducing Power (FRAP)

#### 2-2-4- اندازه‌گیری آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین گلبرگ زعفران با استفاده از روش pH افتراقی تعیین گردید [19]. بدین منظور رقیق‌سازی عصاره‌ها در بافرهای با pH 1 و 4/5 انجام و میزان جذب آن در طول موج‌های 517 و 700 نانومتر به کمک اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

مقدار جذب عصاره (A) طبق معادله (1) و میزان آنتوسیانین مونومری طبق معادله (2) و (3) محاسبه گردید:

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700 \text{ nm}}} )_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700 \text{ nm}}} )_{\text{pH } 4.5} \quad (1)$$

$$\text{محتوای آنتوسیانین (میلی‌گرم/لیتر)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times L) \quad (2)$$

$$\text{بازده (میلی‌گرم/صد گرم گلبرگ خشک)} = 100 / (m) \times (\text{محتوای آنتوسیانین} \times V) \quad (3)$$

در معادله‌های مذکور، A مقدار جذب نمونه، A<sub>λ<sub>vis-max</sub></sub> بیش‌ترین جذب به‌دست آمده، MW وزن مولکولی سیانیدین-تری‌گلیکوزید (گرم بر مول)، DF فاکتور رقت، ε 26900 برابر جذب مولی سیانیدین‌تری‌گلیکوزید، L قطر سل اسپکتروفوتومتر بر حسب سانتی‌متر و 1000 به‌منظور تبدیل گرم به میلی‌گرم، V (لیتر) حجم عصاره استخراج شده و m (گرم) وزن گلبرگ

طرح شامل سه متغیر مستقل در سه سطح و سه تکرار بود. متغیر جداگانه بیان می‌نماید مدل چند متغیره به صورت زیر سطوح متغیرهای مستقل و کدهای مربوطه در جدول (1) و می‌باشد:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش بینی شده،  $b_0$  ضریب

ثابت،  $b_1$ ،  $b_2$ ، و  $b_3$  اثرات خطی،  $b_{11}$ ،  $b_{22}$ ، و  $b_{33}$  اثرات مربعی و  $b_{12}$ ،  $b_{13}$ ، و  $b_{23}$  اثرات متقابل می‌باشند.

برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای وابسته در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل، نمودار سطوح<sup>1</sup> آن‌ها به وسیله این نرم‌افزار ترسیم شدند. به منظور ارزیابی صحت مدل‌های

تیمارهای حاصل در جدول (2) ذکر شده‌اند. برای طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت<sup>1</sup> (نسخه 7) استفاده گردید.

بدین منظور معادلات ریاضی درجه دوم کامل با استفاده از آنالیز رگرسیون گام به گام پس رونده<sup>2</sup> روی متغیرهای وابسته برآزش شدند. در روش باکس بنکن برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر

1. Design Expert

2. Backward multiple stepwise regression

1. Surface Plot

جدول (1) سطوح متغیرهای مستقل و کدهای مربوطه

کد و سطح مربوطه			نماد	متغیرهای مستقل
-1	0	+1		
25	45	65	A	دما (درجه سانتیگراد)
5	10	15	B	زمان (دقیقه)
20	60	100	C	شدت صوت دستگاه (درصد)

جدول (2) تیمارهای تصادفی آزمایش در طرح باکس بنکن

تیمار	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه)	شدت صوت دستگاه (درصد)
1	25	5	60
2	65	5	60
3	25	15	60
4	65	15	60
5	25	10	20
6	65	10	20
7	25	10	100
8	65	10	100
9	45	5	20
10	45	15	20
11	45	5	100
12	45	15	100
13	45	10	60
14	45	10	60
15	45	10	60
16	45	10	60
17	45	10	60

به‌طور کلی دما دارای اثر افزایشی بر استخراج ترکیبات فنولی از منابع گیاهی است [22]. نتایج به‌دست آمده اثر مشخص دمای متوسط در استخراج ترکیبات پلی فنولی از گلبرگ زعفران را نشان می‌دهد. اثر دما در افزایش بازده استخراج به احتمال زیاد به‌دلیل بهبود انتقال جرم در دمای بالاتر در نتیجه افزایش حلالیت ترکیبات فنولی، افزایش ضریب نفوذ و کاهش ضریب گرانروی حلال است [23]. علاوه بر این افزایش دمای استخراج با شکستن پیوندهای بین ترکیبات فنولی با سایر ترکیبات و تاثیرگذاری بر ساختار غشای سلول‌های گیاهی می‌تواند سبب تسهیل فرایند استخراج گردد [24].

معنی‌داری عبارت درجه دوم پارامتر دما نشان می‌دهد که روند افزایشی میزان استخراج پلی‌فنول‌ها تا دمای حدود 45 درجه سانتی‌گراد ادامه یافته و با افزایش بیش‌تر دما کاهش می‌یابد (شکل 1-الف). این پدیده که در پژوهش‌های متعددی گزارش گردیده است، به احتمال زیاد در اثر تخریب و اکسایش برخی پلی‌فنول‌های حساس به حرارت در دماهای بالاتر می‌باشد [25، 26]. در پژوهشی نیز که روی استخراج ترکیبات فنولی از نوعی تمشک سیاه با استفاده از فناوری فراصوت صورت گرفت، بالاترین بازده استخراج ترکیبات فنولی در دمای 60 درجه سانتی‌گراد گزارش گردید [22]. هم‌چنین در پژوهشی که روی استخراج پلی‌فنول‌ها از هسته انگور به کمک فراصوت صورت گرفت، محققین نتیجه تقریباً مشابهی گزارش نمودند. بدین ترتیب که با افزایش دما تا 56 درجه سانتی‌گراد، میزان استخراج ترکیبات پلی فنولی افزایش یافت [27].

همان‌طور که در شکل (1-ب) دیده می‌شود با افزایش زمان از 5 تا 15 دقیقه، میزان بازده استخراج پلی‌فنول‌ها به‌صورت خطی افزایش می‌یابد. سایر محققین نیز در استخراج پلی‌فنول‌ها از توت سیاه و هسته انگور، بیش‌ترین بازده استخراج این ترکیبات را در زمان 15 دقیقه گزارش نمودند [22، 28]. در پژوهشی نیز که روی استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به کمک امواج فراصوت از میوه سنجد زینتی صورت گرفت، محققان در زمان 20 دقیقه بالاترین بازده استخراج ترکیبات پلی فنولی را گزارش نمودند [29]. از طرفی در پژوهشی که روی استخراج پلی‌فنول‌ها از سبوس گندم به کمک فراصوت صورت گرفت، میزان استخراج این ترکیبات از 10 تا 30 دقیقه

برازش داده شده، آزمون ضعف برازش<sup>1</sup>، ضریب تغییرات<sup>2</sup>، مقادیر  $R^2$ ،  $R^2(\text{adj})$ <sup>4</sup> مدل و  $P$ <sup>5</sup> ضرایب تعیین شدند. تایید 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.

### 3- نتایج و بحث

#### 3-1- تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنولی

در جدول (3)، نتایج تجزیه واریانس ترکیبات عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران آورده شده است. عبارات‌های معنی‌دار شامل دما، زمان، توان دستگاه فراصوت و نیز مجذور دما و اثر متقابل زمان و توان فراصوت بودند.

به‌منظور به‌دست آوردن مدل تجربی برای پیش بینی پاسخ، رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم بر داده‌های به‌دست آمده از آزمایش برازش شدند. لذا عبارات بی‌معنی از معادله پیشگو حذف شدند و در نتیجه، روند تغییر ترکیبات فنولی استخراج شده با توجه به مؤلفه‌های استخراج و به صورت نمودار رویه پاسخ در شکل (1) و معادله حاصل در جدول (3)، مشاهده می‌گردد.

بررسی معادله به‌دست آمده برای ترکیبات فنولی استخراج شده نشان می‌دهد که معادله حاصل، از  $R^2(0/99)$  و  $R^2(0/984)$  بالا و معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) برای پیشگویی آن برخوردار است. آزمون ضعف برازش آن بی‌معنی ( $P > 0/05$ ) و ضریب تغییرات آن نیز پایین (1/19) می‌باشد که نشان دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است.

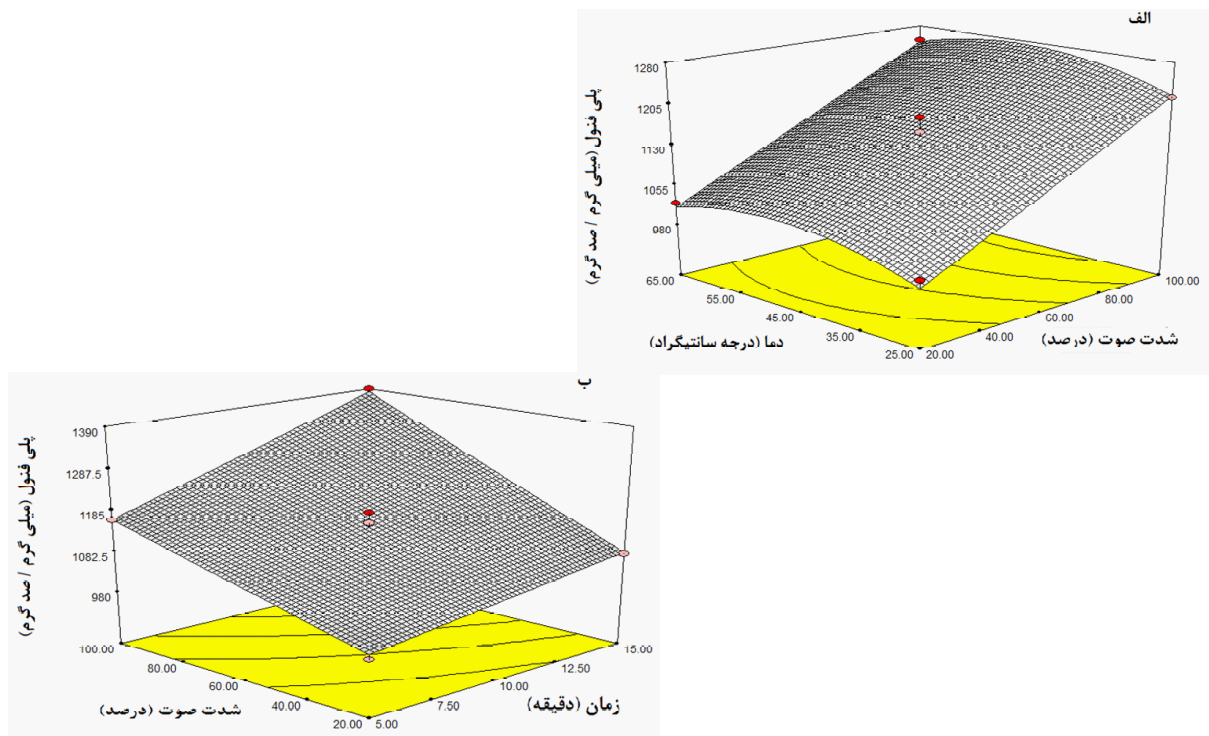
بررسی جدول تجزیه واریانس (جدول 3) نشان می‌دهد که توان دستگاه فراصوت در مقایسه با سایر پارامترهای استخراج، تأثیر بیش‌تری بر مقدار استخراج پلی‌فنول دارد. به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که زمان استخراج و نیز توان دستگاه فراصوت موجب افزایش معنی‌دار راندمان استخراج تیمارها شده‌اند. دما و زمان استخراج از پارامترهای مهم جهت بهینه‌سازی به منظور کاهش هزینه انرژی می‌باشند.

1. Lack of fit
2. Coefficient of Variation (CV)
3. R square
4. R square (adj)
5. P Value

جدول (3) نتایج تجزیه واریانس متغیرهای وابسته در استخراج عصاره گلبرگ زعفران به کمک فراصوت

منبع	درجه آزادی	پلی فنول کل (میلی گرم/100 گرم)		فلاونوئید کل (میلی گرم/100 گرم)		آنتوسیانین کل (میلی گرم/100 گرم)		RSA (%)		FRAP (میلی مولار)	
		مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب	مجموع	ضرایب
مدل	9	167756	702/14***	124/260***	125/9	99/56***	72/99	22/963***	1090/28	1/249***	1/34
A (دما)	1	1468/27	9/256*	ns	ns	0/707**	8/32	0/450*	5/38	0/045*	0/029
B (زمان)	1	46632/76	5/411***	1/05***	86/19	0/301***	18/16	0/723***	335/79	0/067***	0/90
C (شدت صوت)	1	109907/8	1/287***	0/09***	37/39	ns	ns	0/142***	722/19	0/004***	0/28
A <sup>2</sup>	1	5428/30	-0/095***	-0/0012*	0/89	-0/008***	42/24	-0/004**	12/36	-0/004***	0/13
B <sup>2</sup>	1	ns	ns	-0/019*	0/87	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C <sup>2</sup>	1	ns	ns	-0/0003*	0/87	-0/0008*	6/30	ns	ns	ns	ns
AB	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AC	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BC	1	4319/17	0/164***	ns	ns	ns	ns	0/009**	14/55	ns	ns
ضعف برازش	3	654/09	ns	ns	0	ns	0/15	ns	4/13	ns	0/025
خطای باقیمانده	2	992/65			1/53		7/61		3/39		0/018
کل	14	169403			127/43		80/75		1097/80		1/38
ضریب تغییرات		1/19	0/3	0/79	1/68	2/07					
R <sup>2</sup>		0/990	0/988	0/903	0/993	0/968					
Adj R <sup>2</sup>		0/984	0/981	0/850	0/989	0/955					

دما (A)، زمان (B) و شدت صوت (C)؛ یک ستاره (P ≤ 05/0)، دو ستاره (P ≤ 01/0)، سه ستاره (P ≤ 001/0)، ns در سطح 95 درصد معنی دار نمی باشد.



شکل (1) اثر شرایط استخراج بر میزان پلی فنول عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف- اثر دما و شدت صوت، ب- اثر شدت صوت و زمان

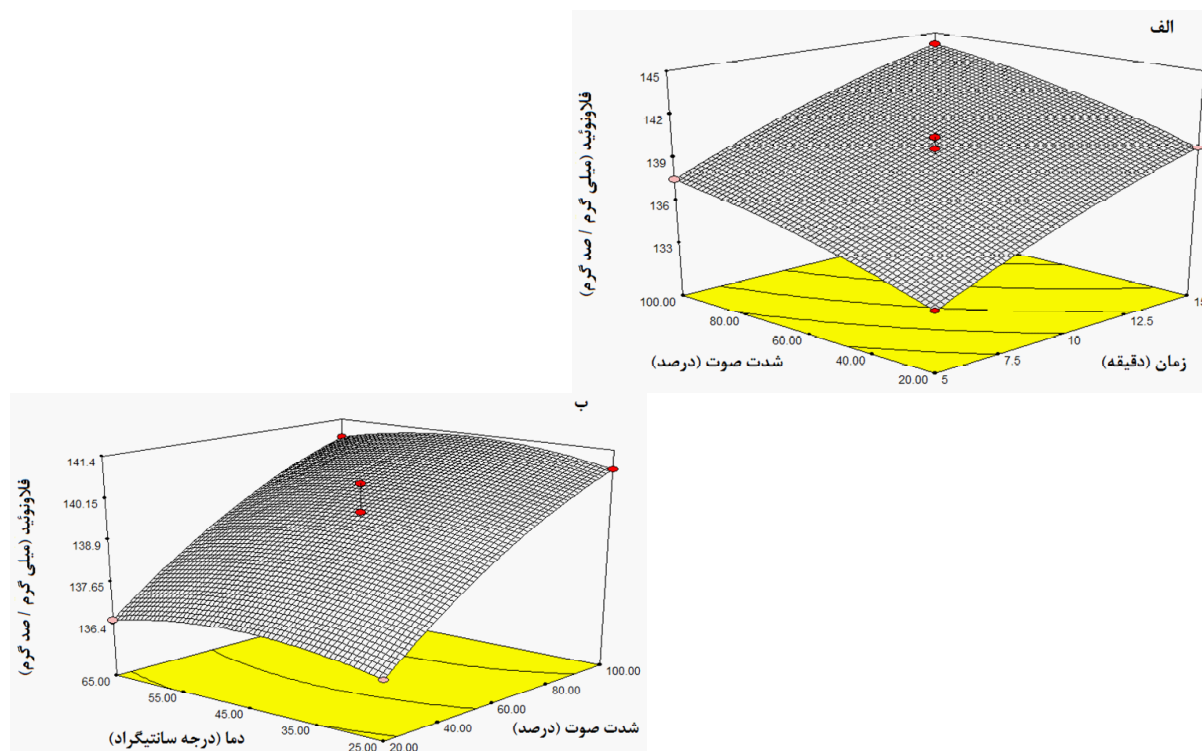
زمان استخراج بیش‌ترین تأثیر را بر مقدار استخراج فلاونوئید دارد. به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که پارامترهای اصلی زمان استخراج و توان دستگاه و پارامترهای درجه دوم دما، زمان و توان دستگاه موجب افزایش معنی‌دار ( $P \leq 0/001$ ) استخراج فلاونوئیدها شد. با توجه به نمودار روبه پاسخ مربوط به محتوای فلاونوئیدی که در شکل 2-الف نشان داده شده، با افزایش زمان استخراج تا 15 دقیقه افزایش معنی‌دار ( $P \leq 0/05$ ) محتوای فلاونوئیدی مشاهده گردید. در پژوهشی که روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی به کمک امواج فراصوت روی میوه سنجد زینتی صورت گرفت، افزایش بازده استخراج این ترکیبات را با افزایش زمان تا 20 دقیقه گزارش نمودند [29]. هم‌چنین با در نظر گرفتن معنی‌داری عبارت درجه دوم پارامتر دما مشخص می‌گردد که با افزایش دمای استخراج تا حدود 50 درجه سانتی‌گراد، میزان استخراج فلاونوئیدهای گلبرگ زعفران تاحدی افزایش و پس از آن اندکی کاهش یافت (شکل 2-ب). از آن‌جا که کوئرستین، کامپفرول و میرستین از جمله ترکیبات فلاونوئیدی غالب در گلبرگ زعفران هستند که مقاومت حرارتی بالایی دارند، از این رو، با افزایش دما به‌دلیل افزایش انحلال پذیری بازده استخراج این ترکیبات افزایش

به‌طور معنی‌داری افزایش یافت اما از 30 تا 50 دقیقه تقریباً ثابت بود [30].

با افزایش توان دستگاه، میزان بازده استخراج پلی‌فنول‌ها به‌طور خطی افزایش یافت (شکل 1-ب). تأثیر شدت صوت دستگاه بر استخراج ترکیبات زیست فعال توسط سایر محققان نیز گزارش گردیده است [31]. در اثر انتشار امواج فراصوت در فاز جامد-مایع، چرخه‌های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد شده که سبب تشکیل حباب‌هایی می‌شود که در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. در واقع افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی به‌دلیل تشدید انتقال جرم ناشی از فروپاشی حباب‌های کایتاسیون در نزدیکی دیواره‌های سلولی می‌باشد که منجر به تماس بهتر بین ترکیبات گیاهی و حلال می‌گردد. هم‌چنین در زمان فروپاشی حباب‌های کایتاسیون، یک جریان سریع امواج فراصوت ایجاد می‌گردد که به‌عنوان یک میکروپمپ عمل کرده و می‌تواند حلال را به درون سلول رانده و ترکیبات مورد نظر را حل کند [32].

### 2-3- تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان استخراج فلاونوئید

بررسی جدول تجزیه واریانس (جدول 3) نشان می‌دهد که



شکل (2) اثر شرایط استخراج بر میزان فلاونوئید عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف- اثر زمان و شدت صوت، ب- اثر شدت صوت و دما

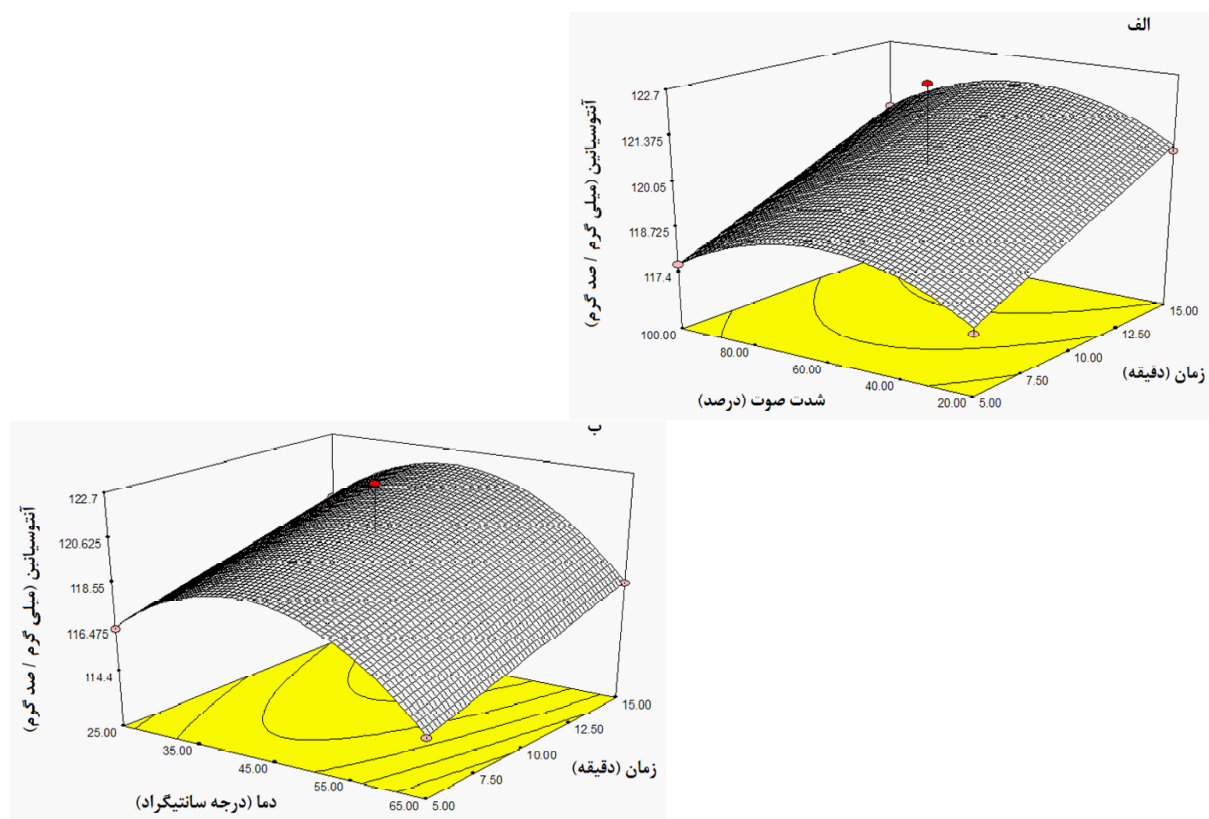


آنتوسیانین و ضرایب معادله مناسب برای پیشگویی این ویژگی ها ملاحظه می‌گردد. روند تغییر بازده استخراج آنتوسیانین با توجه به شرایط استخراج و به صورت نمودار روبه پاسخ در شکل (3) مشاهده می‌گردد. بررسی جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که پارامتر درجه دوم دمای استخراج در مقایسه با سایر پارامترهای استخراج، تأثیر بیش‌تری بر راندمان استخراج آنتوسیانین دارد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که دما و زمان استخراج، مجذور دما و مجذور شدت صوت دستگاه موجب افزایش معنی‌دار ( $P \leq 0/05$ ) بازده استخراج آنتوسیانین گردید. بررسی تغییرات بازده استخراج آنتوسیانین، نشان می‌دهد که معادله حاصل، از  $R^2$  (0/903) و  $R^2$  (adj) (0/850) متناسب، بالا و معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) برای پیشگویی برخوردار است (جدول 3). آزمون ضعف برازش آن بی‌معنی ( $P < 0/05$ ) و ضریب تغییرات آن نیز پایین (0/79) می‌باشد که نشان دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است. بر طبق نمودار روبه پاسخ مربوط به آنتوسیانین (شکل 3، الف)، با افزایش زمان استخراج تا 15 دقیقه، افزایش خطی در میزان این ترکیبات مشاهده

می‌یابد [33]. هم‌چنین اثرات مکانیکی امواج فراصوت باعث افزایش نفوذ حلال به داخل سلول‌های گیاهی و به دنبال آن افزایش بازدهی استخراج در دماهای پایین‌تر می‌گردد [34]. بر طبق نمودار روبه پاسخ، با افزایش توان دستگاه فراصوت، افزایش محتوای فلاونوئیدی در عصاره استخراج شده مشاهده گردید (شکل 2-ب). تأثیر شدت امواج فراصوت بر استخراج فلاونوئیدها توسط محققان مختلفی گزارش گردیده است که افزایش بازده ناشی از آن را با افزایش تخریب دیواره‌های سلولی و در نتیجه خروج و دسترسی بیش‌تر این مواد مرتبط دانسته‌اند. بررسی تغییرات محتوای فلاونوئیدی نشان می‌دهد که معادله حاصل، از  $R^2$  (0/988) و  $R^2$  (adj) (0/981) متناسب، بالا و معنی‌داری ( $P \leq 0/01$ ) برای پیشگویی برخوردار است (جدول 3). آزمون ضعف برازش آن بی‌معنی ( $P > 0/05$ ) و ضریب تغییرات آن پایین (0/3) می‌باشد که تأیید کننده قدرت این مدل است.

### 3-3- تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان استخراج آنتوسیانین

در جدول (3)، تجزیه واریانس متغیرهای وابسته در استخراج



شکل (3) اثر شرایط استخراج بر میزان آنتوسیانین عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف- اثر زمان و شدت صوت، ب- اثر دما و زمان

### 3-4- تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

#### 3-4-1- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله DPPH

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین فعالیت 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 این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس معنی‌دار بودن دما، زمان استخراج و شدت صوت و همچنین عبارت درجه دوم دما و برهمکنش زمان و شدت صوت را نشان می‌دهد. بررسی جدول تجزیه واریانس (جدول 3) نشان می‌دهد که شدت صوت بیش‌ترین تأثیر را بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. بررسی معادله به‌دست آمده برای درصد بازدارندگی رادیکال آزاد نشان می‌دهد که معادله حاصل، از  $R^2(0/993)$  و  $R^2(adj)(0/989)$  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 ( $1/68$ ) می‌باشد که نشان دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است. بر طبق نمودار رویه پاسخ در شکل 4-الف با افزایش زمان استخراج تا 15 دقیقه، افزایش معنی‌دار ( $P \leq 0/0001$ ) درصد بازدارندگی مشاهده گردید. طبق نتایج به‌دست آمده، افزایش استخراج پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نیز با افزایش زمان مشاهده گردید. لذا افزایش درصد بازدارندگی را می‌توان به استخراج بیش‌تر این ترکیبات با افزایش زمان نسبت داد. سایر محققین نیز، در پژوهشی که روی استخراج عصاره از میوه داغداغان<sup>1</sup> به کمک امواج فراصوت صورت گرفت، بیش‌ترین درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH را در زمان 20 دقیقه گزارش نمودند [38].

با توجه به نمودار رویه پاسخ مربوط به درصد بازدارندگی که در شکل 4-ب نشان داده شده، پارامتر دمای استخراج ابتدا موجب افزایش معنی‌دار درصد بازدارندگی ( $P \leq 0/05$ ) تا حدود دمای 45 درجه سانتی‌گراد و سپس کاهش آن با افزایش بیش‌تر دما شده است. با افزایش دما تا این حد، افزایش میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی نیز مشاهده گردید،

1. *Celtis australis*

گردید. در پژوهش‌های مختلفی تأثیر این پارامتر بر استخراج آنتوسیانین‌ها از منابع گیاهی به کمک امواج فراصوت بررسی شده است. در پژوهش‌هایی که روی استخراج آنتوسیانین‌ها از پوست جوز هندی و هسته انگور انجام شد، سایر محققین نیز افزایش بازده استخراج این ترکیبات را با افزایش زمان تا 15 دقیقه گزارش نمودند [28، 34].

محققین دیگر نیز بالاترین میزان ترکیبات آنتوسیانینی استخراج شده از پوره تمشک قرمز را در فرکانس 20 کیلوهرتز پس از طی زمان 10 دقیقه گزارش نمودند [35]. از طرفی در پژوهش دیگری که بر روی استخراج آنتوسیانین‌ها از میوه گارسینیا ایندیکا<sup>1</sup> صورت گرفت، محققین بالاترین میزان استخراج این ترکیبات را در زمان 35 دقیقه و شدت صوت 10-14 درصد گزارش نمودند [36].

با در نظر گرفتن معنی‌داری عبارت درجه دوم پارامتر دما مشخص می‌گردد که با افزایش دمای استخراج تا حدود 40 درجه سانتی‌گراد، میزان استخراج آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد (شکل 3-ب). در واقع با افزایش دما به دلیل تشدید اثر تخریبی آن و حساسیت حرارتی بیش‌تر آنتوسیانین‌ها در مقایسه با ترکیبات پلی‌فنولی، کاهش میزان استخراج این ترکیبات از گلبرگ زعفران مشاهده گردید. افزایش دما، سبب پلیمری شدن و تبدیل آنتوسیانین‌های مونومری به رنگدانه‌های قهوه‌ای یا بی‌رنگ می‌شود، بنابراین در اندازه‌گیری به روش pH افتراقی، رنگدانه‌های پلیمری در مقابل تغییرات pH تغییر رنگ نشان نمی‌دهند [37]. علاوه بر این بر طبق نمودار سطح پاسخ (شکل 3-الف) مربوط به معنی‌داری پارامتر درجه دوم توان دستگاه مشاهده می‌شود که افزایش شدت فراصوت تا حدود 63 درصد، منجر به افزایش بازده استخراج این ترکیبات گردید. ولی در شدت صوت بالاتر روند کاهشی در میزان استخراج این ترکیبات مشاهده گردید. در مقایسه با بازده استخراج پلی‌فنول‌ها، استخراج آنتوسیانین‌ها از گلبرگ زعفران به کمک امواج فراصوت، به زمان و شدت صوت کم‌تری نیاز دارد. آنتوسیانین‌ها به‌طور معمول در شدت صوت پایین‌تری استخراج می‌شوند و این احتمالاً به علت حساسیت بیش‌تر این ترکیبات نسبت به توان فراصوت می‌باشد.

1. *Garcinia indica*

صوت 100 درصد مشاهده گردید. در این تحقیق همبستگی بالا و معنی‌داری بین نتایج به‌دست آمده از دو روش DPPH و FRAP وجود داشت (ضریب همبستگی برابر با  $R^2=0/854$ ،  $P < 0/001$ ).

بررسی تغییرات توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن، نشان می‌دهد که معادله حاصل، از  $R^2 (0/968)$  و  $R^2(\text{adj}) (0/955)$  متناسب، بالا و معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) برای پیشگویی برخوردار است (جدول 3). آزمون ضعف برازش آن بی‌معنی ( $P > 0/05$ ) و ضریب تغییرات آن نیز پایین ( $2/07$ ) می‌باشد که نشان دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است.

### 3-5- بهینه‌سازی

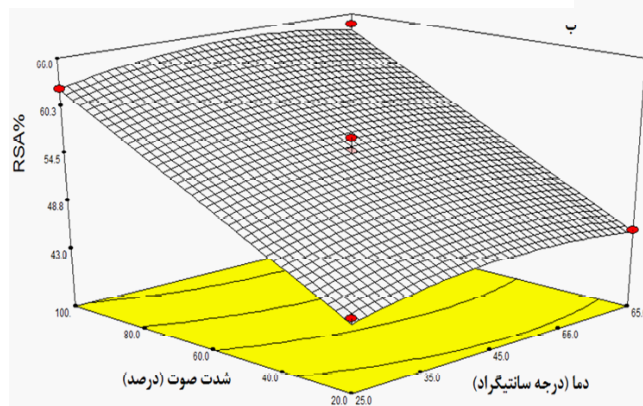
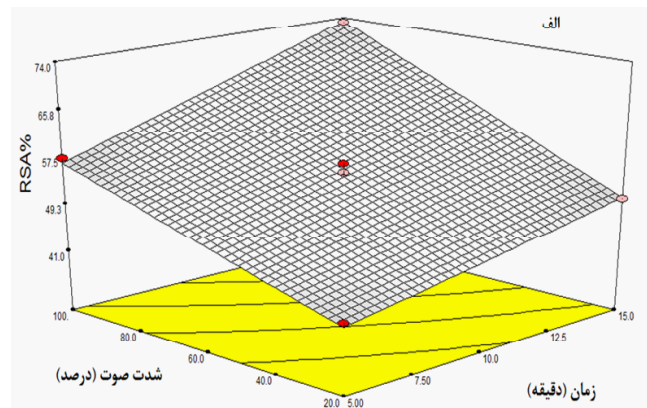
بهینه‌سازی استخراج عصاره گلبرگ زعفران با هدف بیشینه‌سازی بازده استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی انجام شد. نتایج نشان داد، در صورتی که زمان استخراج 15 دقیقه، دمای استخراج 43 درجه سانتی‌گراد و شدت صوت 100 درصد باشد، بیش‌ترین بازده استخراج حاصل می‌گردد. در این شرایط میزان

از این رو، افزایش درصد بازدارندگی را می‌توان به استخراج بالاتر این ترکیبات در این دما نسبت داد.

بر طبق شکل (4-ب) در شدت صوت 100 درصد، بالاترین میزان درصد بازدارندگی مشاهده گردید. در واقع این امر به علت استخراج بالاتر ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی در این شدت صوت در نتیجه افزایش تخریب دیواره‌های سلولی و در نتیجه خروج و دسترسی بیش‌تر این مواد می‌باشد.

### 3-4-2- اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن (FRAP)

بررسی جدول آنالیز واریانس نشان می‌دهد که پارامتر زمان در مقایسه با سایر پارامترهای استخراج، تأثیر بیش‌تری بر توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن دارد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که زمان، دمای استخراج و شدت صوت و همچنین عبارات درجه دوم تأثیر معنی‌داری بر میزان این شاخص داشت. بر طبق شکل (5) بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن در دمای حدود 50 درجه سانتی‌گراد، زمان 15 دقیقه و شدت



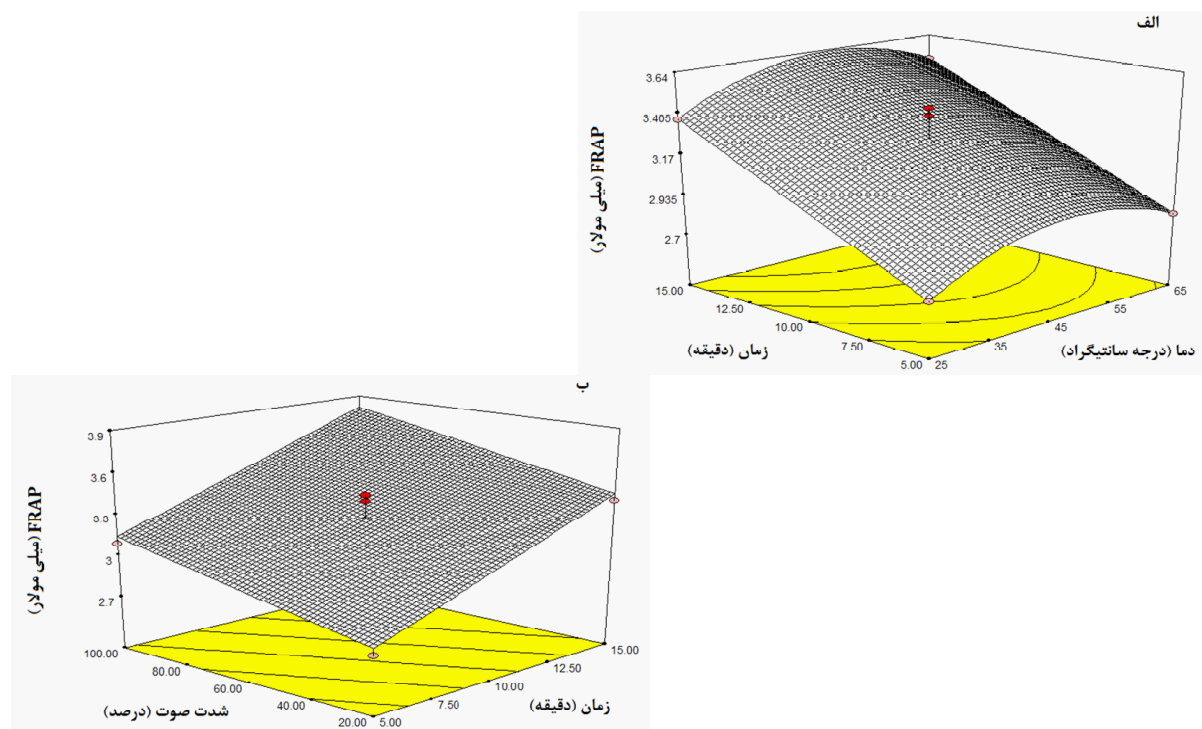
شکل (4) اثر شرایط استخراج بر درصد مهار رادیکال آزاد عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف- اثر شدت صوت و زمان، ب- اثر دما و شدت صوت

زعفران، می‌توان آن را به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی معرفی نمود. آنالیز سطح پاسخ مربوط به طرح باکس‌بنکن با سه متغیر مستقل شامل دما، زمان استخراج و شدت صوت دستگاه به‌عنوان پارامترهای موثر بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گلبرگ زعفران به انجام رسید. نتایج به دست آمده حاکی از آن بودند که روش رویه پاسخ را می‌توان به‌خوبی در ارزیابی بازده فرایند استخراج، به کار برد. هر سه پارامتر دما، زمان استخراج و شدت صوت، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارها شده‌اند. همچنین، مشخص گردید که از میان این پارامترها، زمان و شدت صوت تأثیر بیش‌تر و دمای استخراج شدت تأثیر کم‌تری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته‌است. مدل‌های پیشنهادی در این پژوهش، دارای مقادیر  $R^2$  و  $R^2(\text{adj})$  بالایی هستند که ضعف برازش بی‌معنی و نیز ضریب تغییرات پایین آن‌ها نشان دهنده 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، ویژگی‌های مورد نظر را پیش‌بینی و اصلاح نمود.

ترکیبات پلی‌فنولی 1380 میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک، فلاونوئید 144 میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک، آنتوسیانین 120 میلی‌گرم در صد گرم گلبرگ خشک، درصد به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH 73 درصد و توان آنتی-اکسیدانی احیای آهن 3/8 میلی‌مولار بود. به‌منظور بررسی صحت فرایند بهینه‌سازی شده، تیمار پیشنهادی با شرایط یکسان همانند بقیه تیمارها تولید و نتایج حاصل از بازده ترکیبات پلی‌فنولی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، آزمون DPPH و آزمون FRAP با نتایج پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید (جدول 4). 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.

#### 4- نتیجه‌گیری

گلبرگ‌های زعفران به‌واسطه داشتن مقادیر بالایی از ترکیبات پلی‌فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی هستند. با توجه به غنی بودن پوشش گیاهی شمال شرق کشور از نظر سطح زیرکشت و تولید زعفران و با در نظر گرفتن ارزش تغذیه‌ای و دارویی گلبرگ



شکل (5) اثر شرایط استخراج بر میزان توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن عصاره استخراج شده از گلبرگ زعفران، الف- اثر دما و زمان، ب- اثر شدت صوت و زمان

جدول (4) مقادیر مشاهده شده و پیش بینی شده مربوط به ویژگی‌های مختلف در شرایط بهینه استخراج

ویژگی‌ها	مقادیر مشاهده شده <sup>1</sup>	مقادیر پیش بینی شده <sup>2</sup>
ترکیبات پلی فنولی (میلی گرم / صد گرم)	1380 <sup>a</sup> ±11	1388/3 <sup>a</sup>
فلانوئید (میلی گرم / صد گرم)	144 <sup>a</sup> ±3	147 <sup>a</sup>
آنتوسیانین (میلی گرم / صد گرم)	120 <sup>a</sup> ±3	122/6 <sup>a</sup>
RSA (درصد)	73 <sup>a</sup> ±1	72/08 <sup>a</sup>
FRAP (میلی مولار)	3/8 <sup>a</sup> ±0/3	4/1 <sup>a</sup>

1. میانگین±انحراف معیار

2. حروف یکسان بین مقادیر پیش بینی شده و مقادیر مشاهده شده نشان دهنده عدم معنی داری در سطح 95 درصد می باشد.

## منابع

- [7] 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. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 31(2), 439-442.
- [8] 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. *J. Ethnopharmacol.*, 84(2), 199-203.
- [9] 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. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74(4), 418-425.
- [10] 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. *Funct. Ecol.*, 22(4), 649-654.
- [11] Termentzi, A., Kokkalou, E. (2008). LC-DAD-MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of crocus sativus petal extracts. *Planta Med.*, 74(5), 573-581.
- [12] Sánchez-Vioque, R., Rodríguez-Conde, M., [1] 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 Chem. Toxicol.*, 44(7), 984-993.
- [2] Rodrigues, S., Pinto, G.A., Fernandes, F.A. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.*, 15(1), 95-100.
- [3] Weisburger, J. (1999). Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem. Toxicol.*, 37(9), 943-948.
- [4] 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(25), 74-80.
- [5] Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M. (2003). Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, 64(6), 1133-1139.
- [6] Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol.*, 2(1), 1-8.

- with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food. Chem.*, 45(3), 632-638.
- [21] Benzie, I.F., Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239(1), 70-76.
- [22] D'Alessandro, L.G., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep. Purif. Technol.*, 93, 42-47.
- [23] Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R., Najafi, M.N. (2016). Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 36, 234-244.
- [24] Prasad, K.N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., Jiang, Y. (2009). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 10(2), 155-159.
- [25] Silva, E., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.*, 55(3), 381-387.
- [26] Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 4(3), 675-682.
- [27] Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food. Chem.*, 57(11), 4988-4994.
- [28] Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2013). Reina-Ureña, J., Escolano-Tercero, M., Herraiz-Peñalver, D., Santana-Méridas, O. (2012). In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Ind. Crops Prod.*, 39, 149-153.
- [13] Ulbricht, C., Conquer, J., Costa, D., Hollands, W., Iannuzzi, C., Isaac, R., Jordan, J.K., Ledesma, N., Ostroff, C., Serrano, J.M.G. (2011). An evidence-based systematic review of saffron (*Crocus sativus*) by the natural standard research collaboration. *J. Diet. Suppl.*, 8(1), 58-114.
- [14] 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*. *Pharm. Biol.*, 49(7), 756-763.
- [15] Chan, S., Lee, C., Yap, C., Mustapha, W.A.W., Ho, C. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *Int. Food Res. J.*, 16(2), 203-213.
- [16] Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.*, 8(3), 303-313.
- [17] Mc Donald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.*, 73(1), 73-84.
- [18] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64(4), 555-559.
- [19] 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. *J. AOAC Int.*, 88(5), 1269-1278.
- [20] Von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin

- of solid-liquid extraction of phytochemicals from *Garcinia indica* Choisy by response surface methodology. *Food Res. Int.*, 50(2), 550-556.
- [37] Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.*, 14(3), 217-225.
- [38] نصیری فر، ز؛ صادقی ماهونک، ع؛ کمالی، ف. (1392) تاثیر شرایط عصاره گیری به کمک فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از میوه داغداغان. *فراوری و نگهداری مواد غذایی*، شماره 2، ص 115-130.
- Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.*, 20(4), 1076-1080.
- [29] کمالی، ف؛ صادقی ماهونک، ع؛ نصیری فر، ز. (1394) تاثیر شرایط عصاره گیری به کمک فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از میوه سنجید زینتی. *علوم غذایی و تغذیه*، شماره 2، ص 23-32.
- [30] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.*, 106(2), 804-810.
- [31] Xu, Y., Pan, S. (2013). Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.). *Ultrason. Sonochem.*, 20(4), 1026-1032.
- [32] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J., Mason, T. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.*, 11(3), 261-265.
- [33] Da Costa, E.M., Barbosa Filho, J.M., do Nascimento, T.G., Macêdo, R.O. (2002). Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochim. Acta*, 392, 79-84.
- [34] Cheok, C., Chin, N., Yusof, Y., Talib, R., Law, C. (2013). Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments. *Ind. Crops Prod.*, 50, 1-7.
- [35] Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., Nindo, C. (2013). Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrason. Sonochem.*, 20(5), 1316-1323.
- [36] Nayak, C.A., Rastogi, N.K. (2013). Optimization