بررسی اثر پیش تیمار فراصوت بر میزان ترکیبات موثره و پارامترهای رنگی عصاره زعفران استخراج شده به روش غوطه‌وری

سحر ذکائیان[1]، مهدی جلالی[2]*

۱- مدیر کنترل کیفیت، شرکت زعفران مصطفوی مهر ایرانیان، مشهد، ایران

۲- دانش آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

چکیده

ترکیبات موثره زعفران شامل کروسین، سافرانال و پیکروکروسین است که به ترتیب بر رنگ، طعم و عطر این گیاه دیرینه و ارزشمند ادویه‌ای و دارویی موثر هستند. به منظور استفاده از مواد و متابولیت‌های تولیدی در زعفران، ابتدا باید این ترکیبات را از بافت گیاهی استخراج نمود که یکی از روش‌های سنتی این کار کمک از انواع حلال‌ها می‌باشد، علاوه بر این که می‌توان از روش-های نوین مانند امواج فراصوت نیز استفاده کرد. هدف از این تحقیق بررسی اثر پیش تیمار فراصوت توام با غوطه‌وری در حلال-های آب و اتانول (۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد) بر میزان پارامترهای رنگی (L*a*b*) و تایید صحت نتایج دستگاه اسپکتروفتومتری با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به منظور مقایسه مقادیر کروسین، سافرانال و پیکروکروسین موجود در عصاره زعفران بود. متغیرهای این پژوهش شامل نوع حلال‌های آب و اتانول (۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد) و نوع تیمار غوطه‌وری و غوطه‌وری توام با فراصوت (فرکانس‌های ۳۷ و ۸۰ کیلوهرتز) بودند. نتایج نشان داد که اثر متقابل روش استخراج (ماسراسیون-فراصوت) و نوع حلال (آبی-اتانولی) بر میزان ترکیبات کروسین و سافرانال معنی‌داری بوده ولی اعمال سطوح مختلف تیماری اثری بر مقدار پیکروکروسین مستخرج از عصاره زعفران نداشت. برعکس میزان استخراج ترکیبات کروسین، سافرانال و پیکروکروسین که روش فراصوت در فرکانس بالا توانست روندی تاثیرگذار را نشان دهد، در اندازه‌گیری مولفه‌های رنگی استفاده از روش ماسراسیون موثر بود. اثر متقابل روش ماسراسیون و حلال اتانول (۹۶ درصد) باعث افزایش مولفه‌های رنگی گردید ولی با افزایش فرکانس فراصوت تا ۸۰ کیلوهرتز کاهش مولفه رنگی L* مشاهده شد. نوع روش استخراج، تاثیر معنی‌داری بر مولفه رنگی a* نداشت، اما با افزایش شدت فراصوت این شاخص رنگی، روندی افزایشی ولی با کاهش شدت امواج و اعمال سه سطح اتانول در ابتدا کاهش و سپس

روندی افزایشی را از خود نشان داد که البته این نوع اعمال متغیرهای مستقل، نتیجه‌ای عکس را برای مولفه رنگی b* حاصل کردند. ارزیابی محتوی کروسین، سافرانال و پیکروکروسین در عصاره زعفران به کمک دستگاه HPLC نشان داد، ترکیبات موثره شامل کروسین (گرم۱۰۰/گرم ۱۲/۸۴)، سافرانال (گرم۱۰۰/گرم ۳/۶۰) و پیکروکروسین (گرم۱۰۰/گرم ۶/۰۳) بودند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات مؤثره، فراصوت، ماسراسیون، عصاره زعفران، HPLC

مسئول مکاتبات: mehdijalali62@yahoo.com

۱- مقدمه

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus L.*)، گیاهی چندساله است که به خانواده زنبقیان[1] و راسته لیلیال ها[2] تعلق دارد. این گیاه علفی، بدون ساقه و پیازدار است. کلاله‌های این گیاه پس از خشک شدن، زعفران تجاری را تشکیل می‌دهند که معطر و دارای بوی تند و طعمی تلخ است (۶). از قدیم زعفران به عنوان یک گیاه دارویی و ادویه‌ای شناخته می‌شود و می‌تواند به عنوان مسکن سرفه و برونشیت‌های مزمن، تسکین درد دندان، رفع حالت‌های تشنجی، بی‌خوابی، دفع سنگ کلیه و صفرا، قاعده‌آور، تقویت کننده بینایی و درمان اسهال و کاهش دهنده چربی و کلسترول خون استفاده کرد (۳، ۱۴).

از مهمترین ترکیبات موثره در زعفران می‌توان به کروسین، پیکروکروسین و سافرانال اشاره نمود که به ترتیب در رنگ، طعم و عطر این گیاه تاثیرگذار هستند. عامل اصلی قدرت رنگی زعفران ترکیبی به نام کروسین ($C_{44}H_{64}O_{24}$) بوده که دارای رنگدانه کاروتنوئیدی است. باید توجه نمود مهمترین عامل تشکیل دهنده رنگ زعفران ناشی از کروسین‌های کاروتنوئیدی سیس و ترانس می‌باشد (۳۷). ترکیب ایجاد کننده طعم تلخ در زعفران، گلیکوزیدی بی‌رنگ به نام پیکروکروسین با فرمول شیمیایی ($C_{16}H_{26}O_7$) بوده که ماده‌ای تلخ و قابل تبلور است و از طریق هیدرولیز اسیدی، گلوکز و آلدئیدی به نام سافرانال تولید می‌کند (۲۸). همچنین عطر زعفران مربوط به روغن‌های فرار موجود در آن است که بسیار روان و مایعی بی‌رنگ از رده ترپن‌ها می‌باشد. اسانس‌های استخراجی به سادگی اکسیژن جذب می‌کنند و به مایع غلیظ و قهوه‌ای رنگی به نام سافرانال ($C_{10}H_{14}O_2$) تبدیل می‌شوند (۲۳).

[1] Iridacea
[2] Liliales

گیاهان، که حاوی مقادیر زیادی ترکیبات موثره مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فنولی، رنگدانه‌ها، مواد فیتوشیمیایی، ترکیبات ضد میکروبی و مواد مولد عطر و طعم هستند، می‌توانند در تولید ترکیبات با ارزش نقش مهمی را ایفاء کنند. بنابراین برای تولید و مصرف این ترکیبات موثره از گیاهان، عصاره آن‌ها باید از بافت گیاه خارج گردد. برای این منظور از روش‌های مختلف استخراج به کمک حلال استفاده می‌شود. برای دستیابی به عصاره‌ای با راندمان استخراج بالا از مخلوط حلال‌ها استفاده شده که با توجه به قطبی و غیرقطبی بودن مواد موثره انتخاب می‌شوند. در مورد استخراج ترکیبات قطبی از آب، اتانول، متانول و یا مخلوط آن‌ها و در مورد ترکیبات غیرقطبی از حلال‌های آلی هگزان، اتیل استات، اتر، کلروفرم و ... استفاده می‌گردد، که البته بزرگترین مشکل استفاده از حلال‌های آلی سمی بودن آن‌ها است (۱۷).

در استخراج به روش سنتی (ماسراسیون) که یکی از روش‌های متداول در استخراج ترکیبات موثره از گیاهان است، طی آن ترکیبات مورد نظر بر اساس فرایند انتشار از ماتریکس جامد (نمونه گیاهی) وارد ماتریکس مایع (حلال) می‌شوند. این روش، می-تواند بدون نیاز به تجهیزات پیچیده جهت استخراج ترکیبات موثره از مقادیر زیادی ماده اولیه مورد استفاده قرار گیرد اما بازده استخراج ترکیبات هدف در این روش نسبتا کم است و این روش زمانبر بوده و نیاز به مقدار زیادی حلال دارد، بنابراین در جهت بهبود راندمان، استفاده از روش‌های استخراج جدید با مدت استخراج کوتاه، مصرف حلال کمتر، جلوگیری از آلودگی محیط زیست و محافظت بهتر ترکیبات ناپایدار پیشنهاد می‌شود، که یکی از روش‌های نوین استخراج، استفاده از دستگاه فراصوت است (۷، ۳۵). امواج فراصوت به امواج با فرکانس بیش از ۱۸ کیلوهرتز اطلاق می‌شود و در دو محدوده (فرکانس پایین: ۱۸ تا ۱۰۰ کیلوهرتز) و (فرکانس بالا: ۱۰۰ کیلوهرتز تا ۱۰ مگاهرتز)، طبقه‌بندی می‌شوند. مهم‌ترین دلیل تاثیر امواج فراصوت با شدت بالا، پدیده‌ای به نام کاویتاسیون است. طبق تعریف کاویتاسیون عبارت است از تشکیل، رشد و متلاشی شدن حباب‌های کوچک در مایع در اثر ایجاد فشار منفی بزرگ. در واقع امواج فراصوت با فرکانس بالا موجب ایجاد چرخه انقباضی و انبساطی شده و دیواره سلول‌های هدف در گیاهان را به دلیل وقوع پدیده کاویتاسیون از بین می‌برند و با این شیوه به نفوذ حلال کمک می‌کنند. همچنین ابعاد گیاهان به شدت کاهش یافته که موجب افزایش سطح جامد و نفوذ بهتر حلال و در نهایت افزایش بهره‌وری می‌گردد. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد نوع حلال، توان امواج فراصوت و نیز زمان پارامترهایی تاثیرگذار هستند که برای افزایش بازده باید به دقت مشخص شوند (۱۶، ۲۶، ۳۴).

Alasalvar و Yildirim (۲۰۲۱) به منظور استخراج ترکیبات فنولی گیاه (Lavandula angustifolia) از دستگاه فراصوت و حلال‌های یوتکتیک (که دارای ویژگی‌هایی مانند فشار بخار کم، غیرقابل اشتعال، نقطه ذوب پایین، طبیعت دوقطبی، پایداری

شیمیایی و حرارتی، حلالیت بالا و تنظیم‌پذیری هستند)، استفاده کردند. شرایط بهینه فراصوت در دامنه ۶۰ درصد، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۷/۵ دقیقه حاصل شد که به ترتیب برای محتوای فنولیک معادل ۵۰/۵۰ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم و محتوای فلاونوئیدی معادل ۳۵/۷۹ میلی‌گرم کاتچین در گرم حاصل شد (۴). در مطالعه‌ای که توسط Ebrahimzadeh و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد، اثرات روش‌های مختلف عصاره‌گیری روی محتوای تام فنولی و فلاونوییدی گیاه (salicaria Lythrum) مورد بررسی قرار گرفت. برگ خشک و گل این گیاه با روش‌های مختلف (فراصوت و ماسراسیون) عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی در همه تست‌ها نشان دادند. این تحقیق نشان داد که در این گیاه، محتوای تام فنولی در عصاره اولتراسونیک بیشتر از عصاره ماسراسیون بوده اما محتوای تام فلاونوئیدی در عصاره ماسراسیون بیشتر از عصاره اولتراسونیک بوده است. عصاره اولتراسونیک در تست‌های به دام اندازی رادیکال آزاد (DPPH)، نیتریک اکساید و (H_2O_2) بهتر از عصاره ماسراسیون گزارش شد (۱۰). بنابراین در این تحقیق اثر حلال‌های آب و اتانول و روش‌های فراصوت و ماسراسیون به منظور مقایسه مقادیر ترکیبات موثره از جمله کروسین، سافرانال و پیکروکروسین توسط دستگاه‌های اسپکتروفتومتر و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بر عصاره زعفران بررسی و ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

زعفران درجه یک سرگل از شرکت زعفران مصطفوی در مشهد تهیه گردید. زعفران سرگل صادراتی با دقت بسیار در یک هاون چینی کوبیده شد تا به صورت پودری یکنواخت درآید. پودر زعفران تهیه شده به نحوی الک گردید که ۹۵ درصد آن از الک آزمایشگاهی با مش ۵۰ میکرومتر عبور کند. این فرایند تا حصول نمونه‌هایی کاملاً یکنواخت و هم‌اندازه تکرار شد. همچنین کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت (Merck، آلمان) تهیه شدند.

۲-۲- عصاره‌گیری مستقیم با حلال

جهت عصاره‌گیری مستقیم با حلال، حلال‌های آب و اتانول (۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد) با نسبت ۱۰ به ۱ به پودر زعفران اضافه شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی در ارلن با فویل آلومینیوم پوشانیده شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت هم‌زده شد حاصل صاف شد و روی صافی مجدداً به همراه حلال ۲۴ ساعت دیگر عصاره‌گیری شد (۱).

۲-۳- عصاره‌گیری به کمک فراصوت

بدین منظور، حلا لهای مورد نظر آب و اتانول (۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد) با نسبت ۱۰ به ۱ به پودر زعفران اضافه شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی در ارلن با فویل آلومینیوم پوشانیده شد و در دمای آزمایشگاه در فرکانس (۳۷ و ۸۰ کیلوهرتز) توسط دستگاه فراصوت (مدل S10H، شرکت ELMA، آلمان) و زمان ثابت ۲۰ دقیقه و شدت ۱۰۰ درصد، تحت شرایط امواج فراصوت قرار گرفتند سپس فرایند همانند عصاره‌گیری به روش حلال ادامه یافت (۱).

۲-۴- تعیین پارامترهای رنگی *L، *a و *b

عکس‌برداری از نمونه‌ها با استفاده از تصویربرداری با دوربین (مدل GIX 14.3M، شرکت Canon، ژاپن) انجام گرفت و تغییرات رنگ نمونه‌ها در مدل رنگی CIE L*a*b* با نرم‌افزار Image J (نسخه 1.44 p) بررسی گردید (۳۱).

۲-۵- تعیین مقدار مواد موثره زعفران

مقدار کروسین، سافرانال و پیکروکروسین بر مبنای ثبت چگالی نوری در طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۷۳۱۵، شرکت JENWAY، امریکا) و از طریق معادله زیر محاسبه گردید.

$$A_{1cm}^{1\%}\ (\lambda_{max}) = \frac{A * 10000}{0.5 \times (100 - H)}$$

که در این معادله، λ برای کروسین ۴۴۰ نانومتر، برای سافرانال ۳۳۰ نانومتر و برای پیکروکروسین ۲۵۷ نانومتر، A جذب قرائت شده و H میزان رطوبت زعفران می‌باشد (۱۳).

۲-۶- تعیین محتوی کروسین، سافرانال و پیکروکروسین به روش HPLC

برای جداسازی و شناسایی کروسین، سافرانال و پیکروکروسین زعفران از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Agilent، HPLC 1100، ساخت آمریکا) همراه با آشکارساز آرایه دیودی در ۲۵۰ نانومتر انجام شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از محلول به دستگاه کروماتوگرام تزریق شد. فاز متحرک شامل آب/اسید استیک (به نسبت ۱/۱۹ حجمی/حجمی) (حلال A) و متانول (حلال B) با سرعت جریان ثابت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. گرادیان با ۳۰ درصد حلال B شروع و با ۶۰ درصد در ۴۵ دقیقه، ۷۵ درصد در ۸۵ دقیقه، ۹۰ درصد در ۹۵ دقیقه و بازگشت به ۳۰ درصد در ۱۰۵ دقیقه ادامه پیدا کرد. دمای ستون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد و پردازش کروماتوگرام‌ها با استفاده از نرم‌افزار رایانه کروماتوگرافی کِم استیت (Agilent، NIST chromatography data base، ساخت آمریکا) انجام شد (۲۲).

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی نیز با استفاده از آزمون حداقل میانگین مربعات انجام گرفت. پس از انجام آزمایش در قالب روش پژوهش و جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها در قالب طرح‌های آزمایشی یاد شده و با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تاثیر مستقل و متقابل متغیرها بر کروسین

تجزیه واریانس اثر متقابل متغیرها بر میزان کروسین نشان داد روش‌های فراصوت و ماسراسیون اثر معنی‌داری بر ویژگی مورد آزمون داشت ($P<۰/۰۵$). جدول (۱) مقایسه میانگین اثر متغیرهای مستقل بر میزان کروسین را نشان می‌دهد. در بررسی صورت گرفته میزان استخراج کروسین با ماسراسیون آبی نسبت به اتانولی مقدار کمتری را نشان داد ولی با افزایش بیشتر مقدار حلال اتانول تا ۹۶ درصد روندی نزولی حاصل شد. اختلاف غلظت مادهٔ مؤثره موجود در بافت گیاهی و حلال باعث استخراج مواد مؤثره می‌شود و هر چه این اختلاف غلظت بیشتر باشد، خروج مواد سریعتر و به مقدار بیشتر انجام می‌شود. فرایند استخراج تا هنگام ایجاد تعادل بین غلظت هر یک از ترکیبات، در بافت گیاهی با غلظت آن‌ها که در حلال حل شده، انجام می‌شود و تعادل ایجاد

شده ثابت تعادلی انتشار[1] تابعی از خصوصیات حلال و نوع حلال، حجم و غلظت حلال، خصوصیات حل شونده و دما است (۱۲).

برای بررسی تأثیر نوع حلال و ترکیب آن بر مقدار کروسین استخراج شده از زعفران، آب و اتانول پیشنهادی و ترکیبی از درصدهای حجمی مورد نظر در محدوده‌های ۵۰ تا ۹۶ درصد برای استخراج کروسین از زعفران از امواج فراصوت نیز استفاده شد که نتایج نشان داد، بیشترین میزان کروسین در روش فراصوت با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز با حلال اتانول ۷۰ درصد و کمترین مقدار در روش ماسراسیون با حلال اتانول ۹۶ درصد حاصل گردید. تاثیر فرکانس صوت بر میزان ترکیبات موثره، احتمالا به دلیل نیروی برشی ایجاد شده ومحتوای انرژی بالای این امواج و تأثیر آن‌ها درشکستن و متلاشی کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات آن‌ها به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم می‌باشد، امواج فراصوت همچنین سبب کاهش اندازه ذرات می-شوند که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال افزایش می‌یابد (۱۸).

جدول ۱- اثر متقابل روش استخراج و نوع حلال بر میزان کروسین عصاره زعفران

تیمار	کروسین	تیمار	کروسین
US-۳۷ -W	۲۶۶/۸۰±۰/۶۲^{C}	US-۸۰- E۷۰	۳۰۶/۳۸۷±۰/۷۲^{a}
US-۳۷- E۹۶	۱۰۲/۱۹۹±۰/۲۴^{e}	US-۸۰- E۵۰	۲۸۶/۴۵±۰/۶۷^{b}
US-۳۷- E۷۰	۲۶۱/۳۶±۰/۶۰^{C}	M- W	۱۰۹/۹۴۷±۰/۳۳^{e}
US-۳۷- E۵۰	۱۵۶/۴۳۹±۰/۳۷^{d}	M- E۹۶	۷۳/۵۰±۰/۴۱^{f}
US-۸۰ -W	۲۵۳/۴۰۳±۰/۵۱^{C}	M- E۷۰	۲۹۱/۹۳۷±۰/۶۸^{ab}
US-۸۰- E۹۶	۷۵/۸۱۱±۰/۴۲^{d}	M- E۵۰	۱۵۹/۳۷۱±۰/۴۰^{d}

US: فراصوت، W: آب، E: اتانول، M: ماسراسیون - حروف مشابه از نظر آماری در سطح $P<$۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

۳-۲- تاثیر مستقل و متقابل متغیرها بر سافرانال

تجریه واریانس اثر متقابل نوع استخراج (ماسراسیون-فراصوت) و نوع حلال (آبی-اتانولی) بر میزان سافرانال نشان داد روش‌های فراصوت و ماسراسیون اثر معنی‌داری بر ویژگی مورد آزمون داشت ($P<$۰/۰۵). جدول (۲) مقایسه میانگین اثر متغیرهای مستقل بر میزان سافرانال را نشان می‌دهد. در بررسی صورت گرفته میزان استخراج سافرانال با ماسراسیون با حداقل اتانول (۵۰ درصد) نسبت

[1] Equilibrium distribution constant

به اتانول‌های با سطوح بالاتر مقدار بیشتری سافرانال داشته و حتی ماسراسیون آبی نسبت به ماسراسیون حاوی ۹۶ درصد مقدار سافرانال بیشتری را نشان داد. متداول‌ترین روش استخراج عصاره زعفران، خیساندن (ماسراسیون) می‌باشد. بهترین حلال در این روش مخلوط ۵۰:۵۰ آب – متانول است. محققان مختلفی تاثیر عوامل دخیل در بازده استخراج شامل دما، زمان، نوع حلال، اندازه ذرات، نوع صافی را ارزیابی کرده‌اند. آماده‌سازی عصاره تاثیری بسیار چشمگیر در صحت و دقت اطلاعات دارد. نتایج نشان می-دهد نوع حلال، زمان و روش استخراج نه تنها سرعت نفوذ ترکیبات را از عرض دیواره سلولی تحت تاثیر قرار می‌دهد، بلکه می-تواند پایداری آن‌ها را نیز تغییر دهد (۲۴). با توجه به اینکه سافرانال یک ماده غیرقطبی است و اتانول حلال قطبی کمتری نسبت به آب است، به نظر می‌رسد غلظت‌های متوسط اتانول تأثیر بسیار بهتری بر بازده استخراج این ترکیب نسبت به غلظت‌های پایین‌تر داشته باشد. با این حال، اما به نظر می‌رسد که محتوای سافرانال در غلظت‌های پایین اتانول اغراق‌آمیز شده است. حتی محققان نشان دادند، جذب سیس کروسین‌ها در ۳۳۰ نانومتر می‌تواند دلیل این پدیده باشد (۱۵، ۲۱).

در مقایسه روش‌های استخراجی استفاده از امواج فراصوت توانست تاثیر بیشتری بر مقدار سافرانال داشته و بیشترین میزان سافرانال در فراصوت با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و حلال اتانول ۵۰ درصد حاصل شد. همان طور که جدول (۲) نشان می‌دهد تیمار اولتراسونیک با حلالی مانند اتانول میزان استخراج ترکیبات زیست فعال را افزایش داد. علت این امر، به دلیل تأثیر القایی امواج فراصوت بر ساختمان سلولی است که با ایجاد کاویتاسیون و ترکیدن حباب‌ها موجب افزایش انتقال جرم می‌شوند و دیواره‌های سلولی شکسته شده و واکنش داخلی بین حلال و مواد گیاهی را افزایش می‌دهد. به علاوه امواج فراصوت، قابلیت استخراج مواد در دماهای پایین را بهبود می‌بخشد. در عوض استخراج معمول ترکیبات طبیعی موجود در زعفران ممکن است در اثر عوامل محیطی و آزمایشگاهی مانند حرارت از بین می‌روند و در نتیجه راندمان مناسبی را نداشته اما تحقیقات متعددی نشان دادند که استخراج به کمک فراصوت در دمای پایین راندمان بالاتری را موجب می‌گردد (۴، ۲۵).

جدول ۲- اثر متقابل روش استخراج و نوع حلال بر میزان سافرانال عصاره زعفران

تیمار	سافرانال	تیمار	سافرانال
US-۳۷ -W	۶۸/۴۸±۰/۲۷^{b}	US-۸۰- E۷۰	۶۶/۱۷±۰/۲۶^{c}
US-۳۷- E۹۶	۳۳/۰۹±۰/۱۳^{f}	US-۸۰- E۵۰	۷۶/۰۲±۰/۳۰^{a}
US-۳۷- E۷۰	۶۲/۲۰±۰/۲۵^{d}	M- W	۲۸/۶۹±۰/۱۱^{g}
US-۳۷- E۵۰	۲۵/۹۶±۰/۱۰^{h}	M- E۹۶	۲۱/۳۶±۰/۰۸^{i}
US-۸۰ -W	۶۵/۳۴±۰/۲۵^{c}	M- E۷۰	۶۴/۵۰±۰/۲۵^{c}
US-۸۰- E۹۶	۲۰/۹۴±۰/۰۸^{i}	M- E۵۰	۴۶/۹۱±۰/۱۹^{e}

US: فراصوت، W: آب، E: اتانول، M: ماسراسیون – حروف مشابه از نظر آماری در سطح $P<۰/۰۵$ تفاوت معنی‌داری ندارند.

۳-۳- تاثیر مستقل و متقابل متغیرها بر پیکروکروسین

تجریه واریانس اثر متقابل متغیرهای مستقل بر میزان پیکروکروسین نشان داد روش‌های فراصوت و ماسراسیون و در حلال‌های مختلف عدم معنی‌داری را نشان داد ($P>۰/۰۵$). اما با بررسی مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد به صورت جزئی بیشترین استخراج پیکروکروسین در روش فراصوت با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز با حلال اتانول ۷۰ و ۵۰ درصد حاصل گردید. Sarfarazi و همکاران (۲۰۱۵) در بهینه سازی استخراج مواد موثره زعفران با حلال اتانول (در نسبت‌های ۰ تا ۱۰۰ درصد) از طریق روش سطح پاسخ بیان کردند که با افزایش غلظت اتانول، درجه تخریب غشای سلولی کلاله‌های زعفران نیز افزایش می‌یابد که می‌تواند دلیلی برای افزایش پاسخ پیکروکروسین تا غلظت متوسط اتانول باشد (۳۰). با این وجود، غلظت‌های بالاتر به دلیل دناتوره کردن پروتئین‌های غشای سلولی، سرعت انتقال جرم پیکروکروسین به حلال را کاهش داد (۳۶). میزان پیکروکروسین با افزایش زمان در غلظت‌های پایین و متوسط اتانول کاهش یافت که می‌تواند نتیجه هیدرولیز آن در طول استخراج باشد (۱۵). در نتیجه، افزایش پاسخ در غلظت‌های بالاتر می‌تواند به دلیل آب کمتر در سیستم حلال باشد.

در بررسی میزان پیکروکروسین تاثیرگذاری استخراج با امواج فراصوت تا حدودی موثر نشان داده شد. در واقع در اثر انتشار امواج صوتی در فاز جامد – مایع، چرخه های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد می‌شود که باعث تشکیل حباب‌هایی شده که این حباب-ها در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. این عمل باعث نوسان ذرات جامد و مایع شده و تحت عمل اولتراسونیک سرعت پیدا می‌کنند. درنتیجه مواد حل شونده سریعا از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می‌کنند. علاوه بر این، دیگر اثرات مانند امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می‌کند. در زمان‌های بالاتر ممکن است به دلیل وقوع فعل و انفعالات ناخواسته مانند اکسایش (به علت قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت) میزان استخراج کاهش یابد که این مورد درباره شاخص مورد اندازه‌گیری پیکروکروسین تایید گردید (۲۷).

جدول ۳- اثر متقابل روش استخراج و نوع حلال بر میزان پیکروکروسین عصاره زعفران

تیمار	پیکروکروسین	تیمار	پیکروکروسین
US-۳۷ -W	۴۱/۷۳±۰/۳۸^{d}	US-۸۰- E۷۰	۴۲/۸۱±۰/۴۰^{a}

۴۲/۷۳±۰/۴۰[a]	US-۸۰- E۵۰	۴۱/۸۸±۰/۳۹[d]	US-۳۷- E۹۶
۳۸/۲۲±۰/۳۶[b]	M- W	۴۲/۱۷±۰/۳۹[c]	US-۳۷- E۷۰
۳۸/۸۲±۰/۳۶[b]	M- E۹۶	۴۲/۱۱±۰/۳۹[c]	US-۳۷- E۵۰
۳۹/۸۸±۰/۳۷[b]	M- E۷۰	۴۱/۷۳±۰/۳۸[d]	US-۸۰ -W
۳۹/۷۳±۰/۳۷[b]	M- E۵۰	۴۲/۷۳±۰/۴۰[c]	US-۸۰- E۹۶

US: فراصوت، W: آب، E: اتانول، M: ماسراسیون - حروف مشابه از نظر آماری در سطح $P<۰/۰۵$ تفاوت معنی‌داری ندارند.

۳-۴- تاثیر مستقل و متقابل متغیرها بر مولفه رنگی L*

تجریه واریانس اثر متقابل متغیرها بر مولفه رنگی L* نشان داد روش‌های فراصوت و ماسراسیون اثر معنی‌داری بر ویژگی مورد آزمون داشت ($P<۰/۰۵$). جدول (۴) مقایسه میانگین اثر متغیرهای مستقل بر مولفه رنگی L* را نشان داد. نتایج نشان داد این شاخص با روش ماسراسیون حاوی اتانول ۹۶ درصد می‌تواند بیشترین مقدار را حاصل کند. دلیل افزایش مولفه رنگی L* (نشان دهنده شدت روشنائی) را می‌توان به این صورت توجیه کرد که عامل اصلی قدرت رنگی کلاله‌های زعفران ترکیبی به نام کروسین و مشتق آن کروستین است. کروسین یکی از چند کاروتنوئید محدود موجود در طبیعت است که به آسانی در آب حل می‌شود. در متداول‌ترین روش استخراج عصاره زعغران، که خیساندن (ماسراسیون) است، پس از حذف چربی با دی‌اتیل‌اتر، کلاله ۲ تا ۳ بار با استفاده از حلال‌هایی مانند اتانول یا متانول استخراج می‌گردد. عواملی مانند زمان استخراج، نوع صافی و نوع و درصد حلال بر قدرت رنگی عصاره استخراجی زعفران تاثیر گذاشته که با تحقیق حاضر که از درصد بالاتری از اتانول استفاده شده و کاهش مواد رنگی طبیعی را در پی داشته و باعث افزایش مولفه رنگی L* شد، مطابقت دارد (۱۱).

با اعمال امواج فراصوت در دو سطح (۳۷ و ۸۰ درصد) به منظور بررسی مولفه رنگی L* مشخص شد افزایش میزان فرکانس فراصوت، کاهش میزان روشنی حاصل شد که البته این کاهش معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). در واقع استفاده از فراصوت، می‌تواند باعث حفظ کاروتنوئیدها در گیاهان به ویژه زعفران شود. اما با افزایش شدت فراصوت، کاهش میزان مولفه رنگی L* عصاره زعفران، که به دلیل تخریب رنگدانه‌ها رخ خواهد داد.

جدول ۴- اثر متقابل روش استخراج و نوع حلال بر میزان مولفه رنگی L* عصاره زعفران

L*	تیمار	L*	تیمار
۲۳/۵۷±۰/۲۲^{b}	US-۸۰- E۷۰	۱۹/۰۲۷±۰/۱۸^{c}	US-۳۷ -W
۲۲/۹۴۳±۰/۲۱^{b}	US-۸۰- E۵۰	۲۸/۳۷۴±۰/۲۶^{a}	US-۳۷- E۹۶
۱۹/۲۰۱±۰/۱۷^{c}	M- W	۲۳/۶۲۵±۰/۲۲^{b}	US-۳۷- E۷۰
۲۸/۸۲۱±۰/۲۷^{a}	M- E۹۶	۲۲/۶۶۵±۰/۲۱^{b}	US-۳۷- E۵۰
۲۳/۶۳۷±۰/۲۲^{b}	M- E۷۰	۱۸/۷۹±۰/۱۷^{c}	US-۸۰ -W
۲۳/۱۶۸±۰/۲۲^{b}	M- E۵۰	۲۸/۱۸۸±۰/۲۶^{a}	US-۸۰- E۹۶

US: فراصوت، W: آب، E: اتانول، M: ماسراسیون – حروف مشابه از نظر آماری در سطح $P<$۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

۳-۵- تاثیر مستقل و متقابل متغیرها بر مولفه رنگی a*

تجریه واریانس اثر متقابل نوع استخراج (ماسراسیون-فراصوت) و نوع حلال (آبی-اتانولی) بر مولفه رنگی a* نشان داد متغیرهای مستقل اثر معنی‌داری بر ویژگی مورد آزمون دارند ($P<$۰/۰۵). جدول (۵) مقایسه میانگین اثر متقابل متغیرها بر مولفه رنگی a* را نشان می‌دهد. نتایج نشان دهنده این موضوع بود که شاخص ذکر شده با ماسراسیون با اتانول ۷۰ درصد بیشترین و با افزایش سطح اتانول تا ۹۶ درصد کمترین مقادیر را حاصل می‌کنند. علاوه بر کروسین که دارای ساختار کاروتنوئیدی است، زعفران حاوی آگلیکون‌کروستین به صورت آزاد و مقادیر کمی رنگدانه آنتوسیانین است. تاکنون از حلال‌های آلی مختلفی برای استخراج کاروتنوئیدها از منابع مختلف استفاده شده است که معمولا پیشنهاد مناسب‌ترین حلال، به دلیل تفاوت در قطبیت انواع کاروتنوئیدهای مختلف، پیچیدگی ساختار ماتریکس (بافت) نمونه و ترکیبات موجود در آن، به سادگی امکان‌پذیر نیست. معمولا حلال‌های غیرقطبی مثل هگزان انتخاب خوبی برای استخراج کاروتنوئیدهای غیرقطبی نظیر کاروتن‌ها هستند در حالی که حلال-های قطبی مانند اتانول و استون برای کاروتنوئیدهای غیرقطبی نظیر گزانتوفیل‌ها مناسب‌تر هستند (۵).

توجه به این نکته لازم است که نوع روش استخراج، تاثیر معنی‌داری بر اعداد حاصل شده برای مولفه رنگی a* را نداشت ($P>$۰/۰۵). با افزایش شدت فراصوت مقدار مولفه رنگی a*، روندی افزایشی ولی با کاهش شدت و اعمال سه سطح اتانول در ابتدا کاهش و سپس روندی افزایشی را از خود نشان داد. طوری که با افزایش فرکانس فراصوت (فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و حلال آبی) کمترین مقدار مولفه رنگی a* حاصل شد. اما به منظور دستیابی به رنگ قرمز مطلوب، بهترین سطح (فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و حلال اتانول ۷۰ درصد) مشاهده گردید. اما با توجه به این جدول دیده می‌شود که نمونه‌های تیمار شده با فراصوت، در مقایسه با تیمار کنترل مقدار مولفه رنگی a*، کمتری را دارا هستند که علت آن نیز تغییر شکل و تخریب سلولی نمونه‌ها در اثر امواج

فراصوت، برای خروج راحت‌تر و سریع‌تر رطوبت از داخل عصاره زعفران و در نتیجه ممانعت از واکنش‌های اکسیداسیون آنزیمی می‌باشد. باید ذکر نمود که، کاروتنوئیدها نقش حیاتی در مرکز واکنش فتوسنتزی دارند که، به دلایل مکانیک کوانتومی ناشی از تقارن این مولکول، برای مکانیسم محافظت از نور در برابر اکسیداسیون خودکار نقش ایفا می‌کنند. آن‌ها همچنین در فرایند انتقال انرژی شرکت دارند. در موجودات غیرفوتوسنتز، کاروتنوئیدها به مکانیسم جلوگیری از اکسیداسیون مرتبط شده‌اند (۹).

جدول ۵- اثر متقابل روش استخراج و نوع حلال بر میزان مولفه رنگی *a عصاره زعفران

a*	تیمار	a*	تیمار
۴۲/۳۴۱±۰/۲۷^{a}	US-۸۰- E۷۰	۳۵/۰۹۱±۰/۲۳^{b}	US-۳۷ -W
۴۱/۶۳۸±۰/۲۷^{a}	US-۸۰- E۵۰	۳۸/۳۳۹±۰/۲۵^{ab}	US-۳۷- E۹۶
۳۵/۴۶۴±۰/۲۳^{b}	M- W	۴۲/۴۲۹±۰/۲۸^{a}	US-۳۷- E۷۰
۳۹/۰۳۶±۰/۲۵^{ab}	M- E۹۶	۴۰/۶۲۱±۰/۲۶^{a}	US-۳۷- E۵۰
۴۲/۷۱۷±۰/۲۸^{a}	M- E۷۰	۳۴/۳۸±۰/۲۲^{b}	US-۸۰ -W
۴۱/۷۶۹±۰/۲۷^{a}	M- E۵۰	۴۰/۹۴۱±۰/۲۷^{a}	US-۸۰- E۹۶

US: فراصوت، W: آب، E: اتانول، M: ماسراسیون – حروف مشابه از نظر آماری در سطح $P<$۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

۳-۶- تاثیر مستقل و متقابل متغیرها بر مولفه رنگی *b

جدول (۶) مقایسه میانگین مولفه رنگی *b در سطوح مختلف را نشان می‌دهد که می‌توان دریافت در روش‌ها و حلال‌های مختلف استخراج، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P>$۰/۰۵). اعداد اندازه‌گیری شاخص ذکر شده با ماسراسیون با اتانول ۹۶ درصد بیشترین و کمترین مقدار با روش ماسراسیون و حلال آبی بدست آمد. از میان حلال‌های مورد استفاده جهت استخراج کاروتنوئیدها، اتانول بیشترین قطبیت را داشته (دارای یک سر قطبی و یک سر غیرقطبی) و پس از آن استون و سپس هگزان قرار دارند؛ به عبارت دیگر، به طور کلی هگزان به عنوان یک حلال کاملا غیرقطبی شناخته می‌شود. به سبب آن که اغلب ترکیبات قطبی در حلال‌های قطبی و ترکیبات غیرقطبی در حلال‌های غیرقطبی حل می‌شوند، بنابراین انحلال و استخراج قابل توجه کاروتنوئیدهای غیرقطبی موجود در طبیعت که به طور عمده شامل بتا و آلفاکاروتن هستند، را می‌توان به خوبی در هگزان توجیه و

تفسیر نمود. علیرغم انتظار، ترکیب حجمی حلال‌های فوق نیز نتوانست بازده قابل توجهی از استخراج را نشان دهد. البته بررسی تحقیات دیگر نیز نشان داد که در اغلب موارد ترکیب ۵۰:۵۰ آب – متانول که در مجموع قطبیت بسیار بالایی دارد، نیز راندمان خوبی را در استخراج از خود نشان داد (۵، ۳۲).

اما باید ذکر کرد نوع حلال، تاثیر معنی‌داری بر اعداد حاصل شده برای مولفه رنگی b* داشت ($P<۰/۰۵$). با افزایش شدت امواج فراصوت مولفه رنگی b*، روندی کاهشی حاصل شد ولی با کاهش شدت فراصوت و اعمال سطوح (اتانول ۹۶ تا ۵۰ درصد) مولفه رنگی مورد نظر در ابتدا افزایش و سپس روندی کاهشی را نشان داد. مانند مولفه رنگی a* با اعمال فرکانس فراصوت ۸۰ کیلوهرتز و حلال آبی کمترین مقدار حاصل شد. اما به منظور دستیابی به رنگ زرد مطلوب، بهترین سطح (فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و حلال اتانول ۷۰ درصد) مشاهده شد. در حالی که انتظار می‌رود با افزایش شدت امواج فراصوت نیروی برشی بیشتری ایجاد شده و لذا تخریب سلولی و استخراج با راندمان بالاتر را سبب شود، اما روند مشخصی برای اثر فرکانس‌های در این تحقیق مشاهده نمی‌شود. به طور کلی به نظر می‌رسد که اثر اعمال فرکانس‌های مختلف در استخراج ترکیبات مورد نظر و بخصوص کاروتنوئیدهای عصاره زعفران تا سطح ۷۰ کیلوهرتز در این رابطه، برخی منابع گزارش کرده اند که فرکانس‌های بالاتر از ۶۰ کیلوهرتز احتمالا سبب شکست و یا تغییرات ساختاری در برخی از محتویات مولکولی شده و این امر سبب کاهش راندمان استخراج گردد و در نهایت تاثیر در مولفه‌های رنگی عصاره خواهد داشت (۲۶، ۳۳).

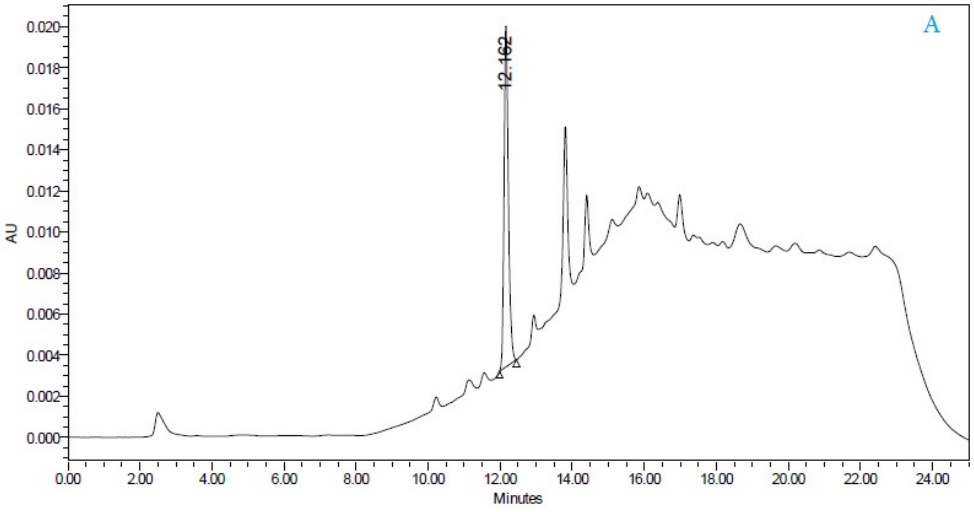
جدول ۶- اثر متقابل روش استخراج و نوع حلال بر میزان مولفه رنگی b* عصاره زعفران

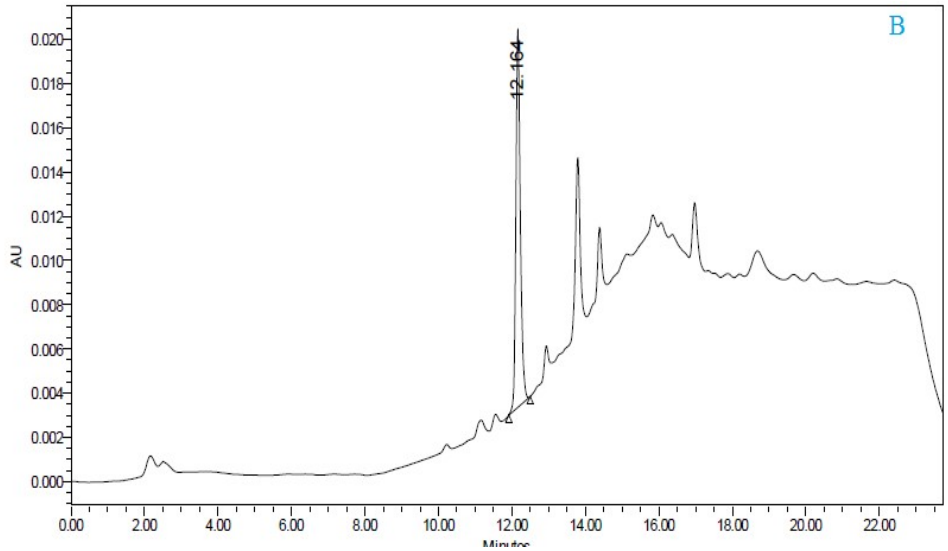
تیمار	b*	تیمار	b*
US-۳۷ -W	۲۲/۲۷۶±۰/۸۶^{c}	US-۸۰- E۷۰	۲۸/۶۱۴±۱/۱۰^{b}
US-۳۷- E۹۶	۳۵/۷۹۷±۱/۳۸^{a}	US-۸۰- E۵۰	۲۷/۷۹۵±۱/۰۷^{b}
US-۳۷- E۷۰	۲۸/۵۵۷±۱/۱۰^{b}	M- W	۲۲/۴۴۷±۰/۸۶^{c}
US-۳۷- E۵۰	۲۷/۳۶۴±۱/۰۵^{b}	M- E۹۶	۳۶/۴۲±۱/۴۰^{a}
US-۸۰ -W	۲۱/۶۲۲±۰/۸۳^{c}	M- E۷۰	۲۸/۶۵۶±۱/۱۰^{b}
US-۸۰- E۹۶	۳۵/۲۵۹±۱/۳۶^{a}	M- E۵۰	۲۷/۶۶۵±۱/۰۷^{b}

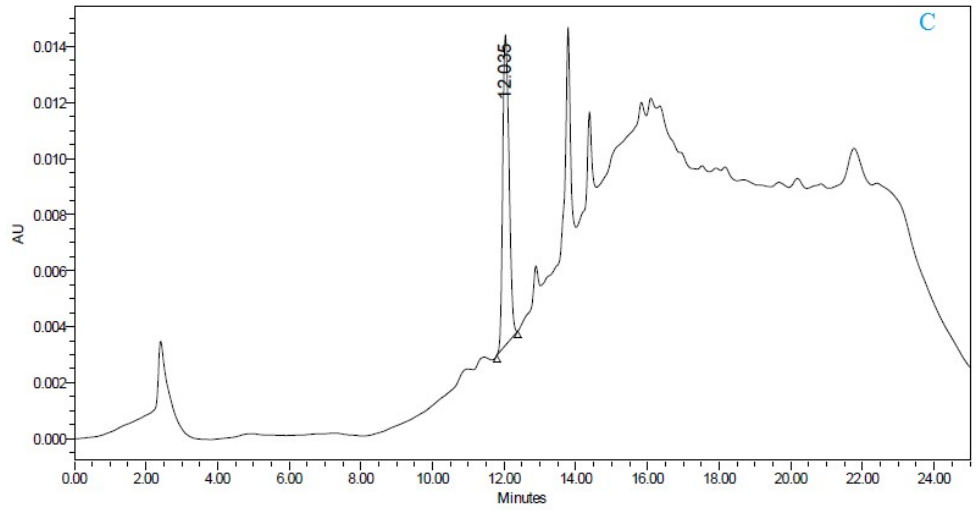
US: فراصوت، W: آب، E: اتانول، M: ماسراسیون – حروف مشابه از نظر آماری در سطح $P<۰/۰۵$ تفاوت معنی‌داری ندارند.

۳-۷- تعیین کروسین، سافرانال و پیکروکروسین با HPLC

به منظور تعیین اثر نوع استخراج (ماسراسیون-فراصوت) و نوع حلال (آبی-اتانولی) و مقدار ترکیبات کروسین، سافرانال و پیکروکروسین استخراج شده، سه نمونه از عصاره‌های استخراج شده به روش‌های ماسراسیون و فراصوت را که دارای بیشترین (شکل ۱-A) و (شکل ۱-B) و کمترین (شکل ۱-C) مقادیر درصد استخراج بودند برای کروماتوگرافی HPLC انتخاب کرده و شناسایی ترکیبات هدف این سه عصاره انجام شد. مقایسه نتایج کروماتوگرافی HPLC نشان داد که استفاده از امواج فراصوت با فرکانس بیشتر موجب استخراج مقادیر بیشتری از سه ترکیب کروسین، سافرانال و پیکروکروسین از عصاره زعفران شده است. بر اساس داده‌های کروماتوگرافی HPLC و آنالیز نرم‌افزار آن، مقدار کل ماده رنگ دهنده زعفران یعنی کروسین در کروماتوگرام عصاره حاصل از روش فراصوت (گرم۱۰۰/گرم) ۱۲/۸۰ گزارش شد در حالی که در عصاره تهیه شده از استخراج به کمک ماسراسیون مقدار (گرم۱۰۰/گرم) ۵/۵۹ به دست آمد. همچنین برای سافرانال (شاخص عطر) و پیکروکروسین (شاخص طعم) زعفران، با استفاده از امواج فراصوت به ترتیب (گرم۱۰۰/گرم) ۳/۶۰ و (گرم۱۰۰/گرم) ۶ حاصل شدند. دستگاه‌های متفاوتی برای تعیین کیفیت زعفران از قبیل کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی گازی (GC) گسترش یافته است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد، دستگاه‌های (TLC) و (HPLC) نتایج قابل مقایسه‌ای برای کروسین، سافرانال و پیکروکروسین ارائه می‌دهند. از HPLC برای بررسی اجزا و درصد خلوص زعفران تجاری بوسیله آشکارساز آرایه دیودی حساس نسبت به نور استفاده می‌گردد (۲۹). اما جهت کمیت‌سنجی کروسین‌ها و اندازه‌گیری پیکروکروسین، سافرانال HTCC و کامفرول‌دی‌گلوسید در نمونه‌های مختلف زعفران کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مجهز به آشکارساز نوری (Vis) و فلورسانس (UV) استفاده می‌شود (۸). Lozano و همکاران (۱۹۹۸) از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به منظور بررسی اجزا و خلوص زعفران تجاری از طریق آشکارساز آرایه دیودی پرداختند. در این روش ۱۰ نوع متابولیت زعفران که مسئول طعم و مزه، عطر و رنگ بودند شناسایی شدند و اندازه‌گیری با دقت، صحت و انتخابگری بالا انجام گرفت. همچنین بعضی از رنگ‌های مصنوعی که استفاده از آن‌ها تقلب محسوب می‌شود، شناسایی و غلظت متابولیت‌های آن‌ها در طول موج‌های مختلف مشخص شد (۲۰).


A
12.162
AU
Minutes


B
12.164
AU



شکل ۱- کروماتوگرام HPLC ترکیبات کروسین، سافرانال و پیکروکروسین عصاره‌های زعفران براساس نوع استخراج و حلال مصرفی

یکی دیگر از اهداف این مطالعه تایید صحت نتایج دستگاه اسپکتروفتومتری عصاره حاصل از زعفران بود که مشخص گردید که دستگاه اسپکتروفتومتری می‌تواند نتایج را بیشتر از حد واقعی آن نشان دهد و روش مناسبی برای ارزیابی ترکیبات موثره زعفران نمی‌باشد که این نتیجه با استفاده از دستگاه HPLC قابل بهبود بوده و صحت‌سنجی است. با بررسی جدول (۷) و توجه به این که علاوه بر روش‌های استخراج (ماسراسیون-فراصوت) نوع حلال که دیگر متغیر مستقل است، می‌تواند تاثیر مستقیمی بر داده‌ها بگذارد. نتایج نشان داد استفاده از ماسراسیون همراه با سطوح ۵۰ و ۷۰ درصد اتانول (پیک های ۵ و ۱۱) می‌تواند مقادیری نزدیک به روش فراصوت را حاصل کند؛ و در پیک (۲) که ترکیب روش ماسراسیون و اتانول ۹۶ درصد است کمترین مقادیر ترکیبات موثره عصاره زعفران مشاهده گردید. در همین تحقیق درباره بررسی کروسین، سافرانال و پیکروکروسین، که با دستگاه اسپکتروفتومتری انجام گردید، استفاده از فرکانس ۸۰ کیلوهرتز فراصوت و حلال اتانول ۷۰ درصد (پیک ۳) و اتانول ۵۰ درصد (پیک ۷) برای ترکیبات کروسین و سافرانال توانست مطابقت با دستگاه HPLC را نشان دهد که البته اعدادی با دقت بالا حاصل شد. برای ترکیب پیکروکروسین بالاترین مقادیر که ارتباط مستقیم با طعم عصاره زعفران دارد، در پیک (۶) که سطح فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و حلال اتانول ۹۶ درصد به کار رفت، مشاهده گردید. Li و همکاران (۱۹۹۹) از روش ساده و حساس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز ماورای بنفش-مریی، برای تعیین انواع کروسین‌های فعال بیولوژیکی استفاده کردند. این روش برای اندازه‌گیری چهار نوع کروسین در سه نمونه زعفران و گیاهان حاوی کروسین به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شد. نتایج نشان داد که از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا توسعه یافته می‌توان به عنوان یک روش کنترل کیفیت گیاهان دارویی

حاوی متابولیت‌های موثر مانند کروسین استفاده کرد (۱۹). یوسفی نژاد و همکاران (۱۴۰۱) از محلول اتانول ۸۰ ٪ عصاره‌گیری پروپولیس ایرانی به منظور بررسی میزان ترکیبات فعال با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا پرداختند که نتایج آن نشان داد که، کریسین در نمونه‌های پروپولیس شناسایی نشد. مقادیر متوسط کوئرستین و کافئیک اسید به ترتیب (گرم/میکروگرم) ۶۵/۴۲۵ و (گرم/میکروگرم) ۲۷/۴۹۸ گزارش شد (۲).

جدول ۷- مقادیر ترکیبات کروسین، سافرانال و پیکروکروسین عصاره‌های زعفران حاصل از دو روش استخراج خیساندن و فراصوت بر اساس نتایج HPLC

شماره پیک	روش استخراج	کروسین	سافرانال	پیکروکروسین	شماره پیک	روش استخراج	کروسین	سافرانال	پیکروکروسین
۱	E۵۰ - US-۳۷	۱۰/۹۳	۳/۱۱	۵/۵۶	۷	E۵۰ - US-۸۰	۱۱/۹۵	۳/۴۴	۵/۶۹
۲	M- E۹۶	۵/۵۹	۲/۹۴	۹/۸۳	۸	W- ۳۷- US	۱۱/۹۴	۳/۴۲	۵/۲۹
۳	E۷۰ - US-۸۰	۱۲/۸۴	۳/۶۶	۶/۰۳	۹	W- ۸۰- US	۱۱/۴۰	۳/۳۹	۵/۹۷
۴	E۷۰ - US-۳۷	۱۱/۶۳	۳/۳۷	۵/۷۴	۱۰	E۹۶ - US-۸۰	۵/۶۴	۲/۸۳	۷/۰۳
۵	M- E۵۰	۱۰/۹۵	۳/۳۸	۵/۷۳	۱۱	M- E۷۰	۱۲/۰۸	۳/۸۴	۶/۲۲
۶	E۹۶ - US-۳۷	۶/۹۲	۳/۳۱	۹/۹۱	۱۲	M- W	۹/۸۲	۲/۷۳	۴/۸۰

US: فراصوت، W: آب، E: اتانول، M: ماسراسیون

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی اثر متقابل نوع استخراج (ماسراسیون-فراصوت) و نوع حلال (آبی-اتانولی) بر میزان ترکیبات موثره زعفران پرداخته شد. نتایج نشان داد اثر متقابل متغیرها بر میزان کروسین و سافرانال تاثیر داشته ولی روش‌های استخراج ماسراسیون و فراصوت در سطوح مختلف حلال‌های مصرفی عدم معنی‌داری را نشان دادند. برعکس مواد موثره زعفران، که روش امواج فراصوت با حلال‌های اتانولی ۵۰ و ۷۰ درصد توانستند بیشترین تاثیرگذاری را داشته باشند، در بررسی مولفه‌های رنگی L*a*b*،

روش ماسراسیون و حلال اتانول ۹۶ درصد توانست اثر مثبتی داشته و به ترتیب باعث کاهش مولفه‌های رنگی *L و *b و افزایش مولفه *a شوند.

۵- منابع

۱. عین افشار سودابه، شرایعی پروین. بررسی تأثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات زیست فعال عصاره پیاز زعفران. *نشریه زراعت و فناوری زعفران*، ۱۳۹۹؛ ۸ (۱): ۹۸-۸۹. DOI: 10.22048/jsat.2019.170014.1336

۲. یوسفی نژاد وحید، درویشی نازیلا، وهابزاده ذکریا، باباحاجیان اسرین، داوودی سید حسین. بررسی میزان ترکیبات فعال در عصاره پروپولیس ایرانی (کردستان) با استفاده از متد کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC). *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان*، ۱۴۰۱؛ ۲۷: ۴۵-۳۸. DOI: 10.52547/sjku.27.2.38

3. Abrishami, M.H. and Jamalzadeh, M. 1987. Understanding of Iranian Saffron. Tous, Tehran, pp. 212-220.

4. Alasalvar H, Yildirim Z. 2021. Ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolic compounds from Lavandula angustifolia flowers using natural deep eutectic solvents: An experimental design approach. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2021; 22: 100492. DOI: 10.1016/j.scp.2021.100492

5. Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014; 56: 49-73. DOI: 10.1016/j.trac.2013.12.011

6. Behnia, M. 1991. Saffron cultivation. Tehran University Publication, pp.112-127. [In Persian].

7. Bhattacharya, S. 2014. Conventional and Advanced Food Processing Technologies: John Wiley & Sons.

8. Caballero-Ortega H, Pereda-Miranda R, Abdullaev FI. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (Crocus sativus L.) sources. *Food Chemistry*, 2007; 100(3): 1126-1131. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.11.020

9. Deng Y, Zhao Y. Effect of pulsed vacuum and ultrasound osmopretreatments on glass transition temperature, texture, microstructure and calcium penetration of dried apples (Fuji). *LWT- Food Science and Technology*, 2008; 41: 1575-1585. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.10.018

10. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of Hyoscyamus squarrosus leaves. *Pharmacologyonline*, 2009; 2: 796-802.

11. Garavand F, Rahaee S, Vahedikia N, Jafari SM. 2019. Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 2019; 89: 26-44. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.05.005

12. Gregory MJ, Menary RC, Davies NW. Effect of drying temperature and air flow on the production and retention of secondary metabolites in saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53(15): 5969-5975. DOI: 10.1021/jf047989j

13. ISO. 2011. Organization for Standardization Technical Specification. Saffron (Crocus sativus L.); Part 2: test methods, No. 3632-2. Geneva, Switzerland.

14. Kamalipour M, Akhondzadeh S. Cardiovascular effects of saffron: An evidence-based review. *The Journal of Tehran University Heart Center*, 2011; 6(2): 59-61.

15. Kanakis CD, Daferera DJ, Tarantilis PA, Polissiou MG. Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in greek saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52(14): 4515-4521. DOI: 10.1021/jf049808j

16. Knorr D, Zenker M, Heinc V, Lee DU. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Science Technology*, 2004; 15: 261-266. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.12.001

17. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 2004; 85: 633-640. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.07.024

18. Lee E, Wylie E, Metcalf C. Ultrasound imaging features of radial scars of the breast, *Australasian Radiology*, 2007; 51(3): 240-245. DOI: 10.1111/j.1440-1673.2007.01719.x

19. Li Na, Lin Ge, Kwan Yiu-Wa, Min Zhi-Da. Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1999; 849: 349-355. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00600-7

20. Lozano P, Castellar MR, Simancas MJ, Iborra JL. Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (Crocus sativus L.) products. *Journal of Chromatography A*, 1999; 830: 477-483. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00938-8

21. Maggi L, Sánchez AM, Carmona M, Kanakis CD, Anastasaki E, Tarantilis PA, Alonso GL. Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (Crocus sativus L.). *Food Chemistry*, 2011; 127(1): 369-373. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.028

22. Mello BCBS, Petrus JCC, Hubinger MD. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 2010; 96(4): 533-539. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2009.08.040

23. Muzzaffar, S. and Azam, I. 2022. Health and medicinal properties of saffron. Book: Handbook of Oleoresins, Ed. 1st., CRC Press, ISBN: 9781003215387.

24. Orfanou O, Tsimidou M. Evaluation of the colouring strength of saffron spice by UV—Vis spectrometry. *Food chemistry*, 1996; 57(3): 463-469. DOI: 10.1016/S0308-8146(96)00003-9

25. Paniwnyk L, Cai H, Albu S, Mason TJ, Cole R. The enhancementand scale up of the extraction of antioxidant from Rosmarius officinalis using ultrasound. *Ultrasond Sonochemistry*, 2009; 16(2): 287-292. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2008.06.007

26. Pedram Nia A, Sabetghadam M, Jalali M. 2022. Optimization of phenolic compounds extraction of chestnut (Aesculus hippocastanum) fruit extract by response surface methodology and and Evaluation of Its Antioxidant Activity on Oxidative Stability of Soybean Oil. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 2022; 18(120): 389-400. [In Persian]. DOI: 10.52547/fsct.18.120.30

27. Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 2003; 1012: 119-128. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)01184-1

28. Sablania, V., Basak, S. and Yadav, V. 2022. Bioactive components in saffron. Book: Spice Bioactive Compounds, Ed. 1st., CRC Press, ISBN: 9781003215387.

29. Salehi A, Shariatifar N, Pirhadi M, Zeinali T. An overview on different detection methods of saffron (Crocus sativus L.) adulterants. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022; 16: 4996-5006. DOI: 10.1007/s11694-022-01586-w

30. Sarfarazi M, Jafari SM, Rajabzadeh G. Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 2015; 8: 2273-2285. DOI: 10.1007/s12161-014-9995-3

31. Seiiedlou S, Ghasemzadeh HR, Hamdami N, Talati FT, Moghaddam M. Convective drying of apple: Mathematical modeling and determination of some quality parameters. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2010; 12: 171-178.

32. Thompson KA, Marshall MR, Sims CA, Wei CI, Sargent SA, Scott JW. Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science*, 2000; 65(5): 791-795. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb13588.x

33. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 2007; 1: 13. DOI: 10.1186/1752-153X-1-13

34. Tzia, C. and Liadakis, G. 2003. Extraction Optimization in Food Engineering. Ed. 1st., CRC Press, ISBN: 9780429164576.

35. Vilkha K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008; 9: 161-169. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.04.014

36. Yang B, Liu X, Gao Y. Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia (Gardenia jasminoides Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2009; 10(4): 610-615. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.03.003

37. Yasmin S, Nehvi FA. Saffron as a valuable spice: A comprehensive review. *African Journal of Agricultural Research*, 2013; 8(3): 234-242. DOI: 10.5897/AJAR12.1955

Studying the effect of ultrasound pretreatment on the amount of active compounds and color components of saffron extract extracted by immersion method

Sahar Zokaeiyan[1], Mahdi Jalali[2*]

1- Quality Control Manager, Mostafavi Saffron Company, Mashhad, Iran

2- Ph.D. graduate, Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

Abstract

The effective ingredients of saffron include crocin, picrocrocin and safranal, which are respectively effective on the color, taste, and aroma of this ancient and valuable medicinal and spice plant. In order to use the substances and metabolites produced in saffron, these compounds must first be extracted from the plant tissue, and one of the traditional methods of this work is the help of various solvents, in addition, modern methods such as ultrasound waves can also be used. The aim of this study was to investigate the effect of ultrasound pretreatment combined with immersion in water and ethanol solvents (50, 70, and 96 %) on the amount of color components (L*a*b*) and to confirm the accuracy of the results of the spectrophotometric device with high-performance liquid chromatography (HPLC) in order to compare the amounts of crocin, safranal, and picrocrocin present in saffron extract. The variables of this study included the type of water and ethanol solvents (50, 70, and 96 %) and the type of immersion treatment and immersion combined with ultrasound (frequencies of 37 and 80 kHz). The results showed that the interaction effect of the extraction method (maceration-ultrasound) and the type of solvent (aqueous-ethanol) was significant on the amount of crocin and safranal compounds, but the application of different levels of treatment had no effect on the amount of picrocrocin extracted from saffron extract. On the contrary, the amount of extraction of crocin, picrocrocin and safranal compounds, which the high-frequency ultrasound method could show an effective trend, the use of maceration method was effective in measuring color components. The mutual effect of maceration method and ethanol solvent (96%) increased the color components, but with the increase of ultrasound frequency up to 80 kHz, the color component L* decreased. The type of extraction method did not have a significant effect on the color component a*, but with the increase in the intensity of the ultrasound, this color index showed an increasing trend, but with the decrease in the intensity of the waves and the application of three levels of ethanol, it first showed a decrease and then an increasing trend, which of course, this type of application of independent variables produced the opposite result for the color component b*. The evaluation of crocin, picrocrocin and safranal content in saffron extract with the help of HPLC showed that the effective compounds included crocin (12.84 g/100g), safranal (3.60 g/100g) and picrocrocin (6.03 g/100g).

Keywords: Effective compounds, Ultrasound, Maceration, Saffron extract, HPLC

Corresponding author: mehdijalali62@yahoo.com