



بهینه سازی استخراج رنگدانه آنتوسیانین از گلبرگ گل گاوزبان به روش خیساندن و حلال

لیلا ناطقی*، عماد یوسفی، نازنین زند

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۰۶

چکیده

سابقه و هدف: رنگ یکی از مهمترین عوامل برای پذیرش مصرف کننده است. پیگمان (ترکیبات رنگ دهنده طبیعی) از ایمن ترین رنگ ها برای استفاده خوراکی محسوب می شوند. آنتوسیانین ها مهم ترین گروه از رنگدانه های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که غیرسمی و محلول در آب بوده و در سطح وسیعی در سیتوپلاسم گیاهی وجود دارند. این رنگدانه های فلاونوئیدی مسئول رنگ های قرمز، آبی و بنفش در بسیاری از میوه ها، سبزی ها و گل ها می باشند. در ایران و بسیاری از نقاط دنیا گیاه گاوزبان به منظور استفاده های دارویی از گل و برگ کشت می شود. هدف کلی از این پژوهش، بهینه سازی شرایط استخراج رنگدانه آنتوسیانین از گلبرگ گل گاوزبان به روش خیساندن در حلال (متانول/آب) بود.

مواد و روش ها: به منظور دستیابی به بالاترین میزان استخراج رنگدانه آنتوسیانین از گلبرگ گل گاوزبان اثر سه متغیر دما (۶۰، ۵۰ و ۴۰ درجه سانتی گراد)، زمان (۳، ۴ و ۵ ساعت) و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال (۳ و ۵ گرم) مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین ۱۸ تیمار مطابق با طراحی فاکتوریل کامل طراحی گردید. متانول و آب به نسبت ۰/۵:۱/۵ (حجمی/حجمی) با هم مخلوط گردیدند. میزان آنتوسیانین عصاره استخراج شده از هر تیمار با استفاده از روش pH افتراقی و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. با استفاده از نتایج بدست آمده از آزمون ها بهترین شرایط برای استخراج عصاره از گلبرگ گل گاوزبان با بالاترین میزان آنتوسیانین پیش بینی شد. تجزیه و تحلیل های آماری در نرم افزار مینی تب ۱۶ به صورت طرح فاکتوریل کامل انجام شد.

یافته ها: اثرات خطی دما، زمان و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال بر تغییرات میزان آنتوسیانین معنی دار بود. اثرات متقابل و درجه دوم دما، زمان و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال بر تغییرات آنتوسیانین معنی دار نبود. نتایج نشان داد با افزایش دما، زمان و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال میزان آنتوسیانین استخراجی افزایش معنی داری داشت. شرایط بهینه در جهت استخراج بیشترین میزان آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ گل گاوزبان (۲۱۹/۱۳۱ میلی گرم بر لیتر) به ترتیب در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، زمان ۵ ساعت و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال ۵ گرم پیش بینی شد. شرایط بهینه پیش بینی شده برای استخراج رنگدانه از گلبرگ گل گاوزبان به صورت عملی در آزمایشگاه انجام گردید. بر اساس نتایج اختلاف معنی داری بین میزان آنتوسیانین استخراج شده در شرایط پیش بینی شده و تجربی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: با جایگزینی رنگ های مصنوعی متداول با رنگ های طبیعی در مواد غذایی می توان گامی مثبت در جهت سلامت بخشی و ایمنی مواد غذایی برداشت. طرح فاکتوریل کامل روشی مطمئن برای پیش بینی شرایط استخراج رنگدانه گیاهان می باشد.

واژه های کلیدی: گل گاوزبان، آنتوسیانین، استخراج، بهینه سازی.

*مسئول مکاتبه: leylanateghi@yahoo.com leylanatheghi@iauvaramin.ac.ir

مقدمه

رنگ در مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در واقع اولین ویژگی غذا است که توسط مصرف کننده مورد توجه قرار می‌گیرد. ترکیبات رنگی بر کیفیت، مزه و طعم غذا تأثیر می‌گذارند؛ به طوری که ویژگی‌های حسی اشاره شده ابتدا بر اساس رنگ تشخیص داده می‌شود (۴). امروزه یکی از مهمترین بحث‌ها در صنعت غذا افزایش تقاضا برای رنگ‌های غذایی تهیه شده از منابع طبیعی می‌باشد که می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب از لحاظ ایمنی و سلامت برای رنگ‌های مصنوعی باشند (۱۵). آنتوسیانین‌ها مهم‌ترین گروه از رنگدانه‌های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که غیرسمی و محلول در آب بوده و در سطح وسیعی در سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی وجود دارند. این رنگدانه‌های فلاونوئیدی^۱ مسئول رنگ‌های قرمز، آبی و بنفش در بسیاری از میوه‌ها، سبزی‌ها و گل‌ها می‌باشند (۱، ۳). آنتوسیانین‌ها بعلاوه داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضد سرطانی، سلامت قلب و عروق جهت کاربرد در صنعت غذا مورد توجه محققین هستند (۲۲). گیاه گاوزبان (*Echium amoenum*) یکی از گیاهان دارویی مهم کشور است که حاوی ترکیبات موثر آنتوسیانین است. این گیاه از تیره گاوزبان، علفی، یک‌ساله، با ارتفاع ۴۵-۷۰ سانتی‌متر با رنگ گل‌های آبی و به ندرت سفید یا گلی می‌باشد. زمان مناسب برای کشت این گیاه اوایل بهار بوده، همچنین با توجه به شرایط محیطی امکان کشت آن در پاییز و اواخر زمستان نیز وجود دارد. این گیاه امروزه در اکثر نقاط دنیا به‌منظور استفاده‌های درمانی کشت و از گل و برگ این گیاه به عنوان یک ماده معرق، آرام‌کننده و تصفیه‌کننده خون استفاده می‌شود (۲۵). گیاه گاوزبان در مناطق شمالی ایران (گیلان، مازندران، کندوان و گرگان)، ارتفاعات حیران

و قزوین کشت می‌شود و میزان تولید در ایران حدود ۳۰۰ تا ۳۵۰ تن گزارش شده است (۱۶). روش‌های استخراج رنگدانه‌ها و ترکیبات فعال از گیاهان شامل استفاده از روش غرقابی، سوکسله، امواج فراصوت، ریزموج، استخراج توسط سیال فوق بحرانی و استخراج تسریع شده به روش حلال می‌باشد. مهمترین عوامل و فاکتورهای تأثیرگذار بر استخراج رنگدانه‌ها از گیاهان شامل نوع حلال، نسبت جامد به مایع، دما، فشار و زمان استخراج می‌باشد (۶). با توجه به اینکه آنتوسیانین‌ها در دمای بالاتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد تخریب می‌شوند بنابراین برای استخراج آن عموماً از دماهای پایین استفاده می‌شود (۱۲). متیویر و همکاران (۱۹۸۰) اثرات دو گروه حلال (اتانول، متانول، آب) و اسید (اسید هیدروکلریدریک، اسید سیتریک، اسید تارتاریک، اسید فرمیک، اسید استیک، اسید پروپیونیک) بر میزان استخراج رنگدانه آنتوسیانین از تفاله انگور قرمز را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج متانول در مقایسه با اتانول و آب به ترتیب با ۲۰ و ۷۳ درصد کارایی بهترین استخراج‌کننده و هیدروکلریدریک اسید مؤثرتر از اتانول بود. در میان اسیدهای آلی، اسید سیتریک با متانول و اسید استیک با آب مؤثرتر بودند (۱۴). زارع‌زاده مهریزی و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهشی پیرامون شناسایی کمی و کیفی آنتوسیانین‌های استخراج شده به روش سوکسله از عصاره پوست خشک سه رقم انار ایرانی توسط چهار حلال با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان دادند در میان حلال‌ها اتانول و در بین ارقام انار، پوست سیاه اردستان با سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد بیشترین میانگین راندمان استخراج آنتوسیانین را داشتند (۲۴). مهدوی خزاعی و همکاران (۲۰۱۴) با معرفی آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ زعفران به‌عنوان جایگزینی بالقوه جهت تولید رنگ طبیعی در

1. Flavenoid

انجام گرفت (۱۰). طراحی تیمارها مطابق با طراحی فاکتوریل کامل با سه متغیر مستقل دما (۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳، ۴ و ۵ ساعت) و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال (۳ و ۵ گرم) مطابق با جدول ۲ انجام پذیرفت. گلبرگ‌های گل گاوزبان بوسیله آسیاب پارس خزر مدل ۱۲۳-هاردون (رشت، ایران) به صورت پودر درآمدند و برای استخراج رنگدانه آنتوسیانین از گلبرگ گل گاوزبان از روش خیساندن و حلال (متانول/آب) استفاده شد. متانول و آب به نسبت ۰/۵ به ۱/۵ (حجمی/حجمی) برای استخراج رنگدانه با هم مخلوط گردیدند. ۵۰ میلی‌لیتر از حلال آماده شده به ارلن مخروطی آزمایشگاه ۲۵۰ میلی‌لیتر منتقل و سپس گلبرگ گل گاوزبان مطابق با مقادیر ذکر شده در جدول تیمارها (جدول ۲) به آن اضافه شد. برای جلوگیری از تبخیر حلال درب ارلن توسط پوشش پلی‌اتیلنی محکم بسته شد و سپس در لرزاننده^۱ (پل ایده آل، مدل PIT10LO، تهران، ایران) با درجه حرارت و زمان مناسب ذکر شده در جدول ۲ برای استخراج کامل رنگدانه نگه داشته شد (۱۰).

تعیین میزان ترکیبات آنتوسیانین: مقدار ترکیبات آنتوسیانین با استفاده از روش pH افتراقی تعیین گردید. ابتدا ۲ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده گیاهی با ۲۵ میلی‌لیتر محلول بافر دارای pH=۱ که شامل مخلوط کلرید پتاسیم ۰/۲ مولار و اسید کلریدریک ۰/۲ مولار به حجم رسانده شده و سپس ۲ میلی‌لیتر دیگر از این عصاره استخراج شده گیاهی با محلول بافر دارای pH= ۴/۵ (شامل مخلوط استات سدیم ۱ مولار و اسید کلریدریک ۱ مولار) به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل HACH- DR/4000U (ساخت کشور آمریکا) خوانده

صنایع غذایی و دارویی موفق به استخراج از ۱۶۰۹/۱۱ میلی‌گرم آنتوسیانین به ازاء هر لیتر عصاره گلبرگ زعفران شدند (۱۲). فخاری زواره و باقی‌پور (۲۰۰۹) با استخراج رنگدانه موجود در چغندر قرمز بیان کردند این ماده ظرفیت بالایی برای استفاده در صنایع غذایی بویژه مواد غذایی سرد نظیر بستنی، شربت‌های یخ، ماست، پوشش‌های شیرینی و کرم‌های میانی شیرینی دارد (۵). به‌منظور بررسی اثرات متغیرهای مستقل بر راندمان استخراج رنگدانه‌ها عمدتاً آزمون‌هایی پرتکرار با صرف وقت و هزینه صورت می‌گیرد. روش طرح فاکتوریل کامل قابلیت بررسی اثرات خطی، مربعی و متقابل متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته همراه با دستیابی به نقطه بهینه را بدون تکرار با ضریب اطمینان بالا فراهم می‌نماید (۱۰). از آنجایی که گلبرگ گیاه گاوزبان دارای ترکیبات موثر و مفید درمانی بوده و نسبت به سایر منابع آنتوسیانین‌ها در ایران در دسترس و فراوان است؛ لذا هدف از پژوهش حاضر تعیین شرایط بهینه استخراج (دما، زمان و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال) جهت دستیابی به بالاترین میزان بازده استخراج رنگدانه آنتوسیانین از گلبرگ گیاه گاوزبان و تولید رنگ طبیعی حاوی آنتوسیانین بود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: گلبرگ گل گاوزبان از شرکت ربیع (کاشان، ایران) تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل کلرید پتاسیم، اسید کلریدریک، استات سدیم و متانول از نمایندگی شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

استخراج رنگدانه از برگ گل گاوزبان: استخراج عصاره گلبرگ گل گاوزبان پس از انجام آزمون‌های اولیه لازم جهت بدست آوردن سطوح متغیرهای مستقل مطابق با روش کومار و همکاران (۲۰۱۷)

شد. غلظت آنتوسیانین‌ها توسط رابطه ۱ محاسبه گردید (۲۰).

رابطه ۱.

$$C_{mg/l} = \frac{(Abs\ pH\ 1 - Abs\ pH\ 4.5) \times 484.82 \times 1000}{24825} \times DF$$

اعداد ۴۸۴/۸۲ و ۲۴۸۲۵ به ترتیب وزن مولکولی و ضریب جذب مولی مولکول سیانیدین -۳- گلوکوزید در طول موج ۵۱۰ نانومتر در محلول بافری می‌باشد. DF نیز عامل رقت محسوب می‌شود (۲۰).

روش تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق جهت طراحی تیمارها و بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگدانه از گلبرگ گل گاوزبان و دستیابی به بالاترین میزان آنتوسیانین در عصاره استخراج شده از طرح فاکتوریل کامل استفاده شد. شرایط استخراج سه فاکتور مستقل دما (۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳، ۴ و ۵ ساعت) و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال (۳ و ۵ گرم) بودند. بنابراین ۱۸ تیمار طراحی شد. نتایج حاصل از آزمون‌ها توسط نرم افزار مینی‌تب ۱۶ به روش طراحی فاکتوریل کامل تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

مدل سازی فرآیند استخراج رنگدانه آنتوسیانین گلبرگ گل گاوزبان: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ پیش‌بینی شده برای میزان رنگدانه آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ گل گاوزبان در جدول نشان داده شده است. ضریب تبیین بالا ($R^2 = 96/09$) حاکی از اطمینان به مدل پیش‌بینی شده نسبت به داده‌های آزمایشی بود. بر طبق نتایج آنالیز واریانس، اثرات خطی هر سه متغیر زمان، دما و وزن نمونه بر روی میزان آنتوسیانین معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$).

اثرات متقابل و درجه دوم متغیرهای مستقل بر روی تغییرات آنتوسیانین معنی‌دار نبود ($P \geq 0/05$). آزمون‌های تصادفی آزمایش در طرح فاکتوریل کامل داده‌های تجربی مرتبط با میزان کل رنگدانه آنتوسیانین استخراج شده در جدول ۲ ارائه شده است. میزان کل رنگدانه آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ گل گاوزبان در دامنه ۲۲۱/۵۰-۱۶۱/۸۳ درصد می‌باشد. نتایج نشان داد افزایش دما (از ۴۰ به ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان استخراج (از ۳ به ۵ ساعت) و نسبت وزن نمونه به حلال (از ۳ به ۵ گرم) اثرات معنی‌داری بر افزایش میزان آنتوسیانین داشت ($P \leq 0/05$).

در رابطه ۲ مدل چندجمله‌ای درجه دوم کامل به دست آمده به منظور پیش‌بینی میزان رنگدانه آنتوسیانین استخراج شده بر اساس مقادیر متغیرهای مستقل زمان (A)، درجه حرارت (B) و وزن نمونه (C) بدست آمد.

رابطه ۲.

$$y = 195.921 + 13.508A + 7.134B + 13.705C - 1.031A^2 + 1.623B^2 + 1.158AB - 1.977AC - 3.992BC$$

مقادیر باقیمانده جدول ۲ که نشان‌دهنده تفاوت بین میزان عددی پیش‌بینی و مقدار تجربی است، برازش معقول نقطه مورد آزمایش با مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل را نشان می‌دهد.

اثرات متقابل متغیرهای مستقل بر میزان رنگدانه آنتوسیانین استخراج شده: اثرات متقابل متغیرهای مستقل مورد مطالعه بر میزان رنگدانه آنتوسیانین استخراج شده به صورت نمودارهای سه بعدی در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- آنالیز واریانس میزان آنتوسیانین در دما، زمان و وزن‌های مختلف

Table 1. Analysis of variance (ANOVA) for anthocyanin content at different extraction condition (temperatures, times, and weights)

مقدار P P-value	مقدار F F-value	مجموع مربعات sum of squares	میانگین مربعات Mean square	کارایی رگرسیون Regression Coefficients	درجه آزادی degrees of freedom	منبع تغییرات Source
0.000*	27.66	6444.87	805.61	195.921	8	رگرسیون Regression
0.000*	70.75	6181.16	2060.39	-	3	اثرات خطی Linear effects
0.000*	75.19	2189.52	2189.52	13.508	1	دما (A) Temperature (A)
0.001*	20.97	610.76	610.76	7.134	1	زمان (B) Time (B)
0.000*	116.10	3380.89	3380.89	13.705	1	وزن نمونه (C) Sample weight (C)
0.0781	0.25	14.79	7.39	-	2	اثرات درجه دوم Quadratic effects
0.711	0.15	4.25	4.25	-1.031	1	دما × دما (A ²) Temperature (A ²)× Temperature
0.562	0.36	10.54	10.54	1.623	1	زمان × زمان (B ²) Time×Time (B ²)
0.097	2.85	248.91	82.97	-	3	اثر متقابل Interaction effects
0.559	0.37	10.72	10.72	1.158	1	دما × زمان (A×B) Temperature×Time (A×B)
0.236	1.61	46.91	46.91	-1.977	1	دما × وزن نمونه (A×C) Temperature× Sample weight (A×C)
0.031	6.57	191.28	191.28	-3.992	1	زمان × وزن نمونه (B×C) Sample weight (B×C) ×Time
-	-	262.09	29.12	-	9	باقی مانده Residual
-	-	6706.96	-	-	17	کل Total
			96.09%			ضریب تبیین R ²

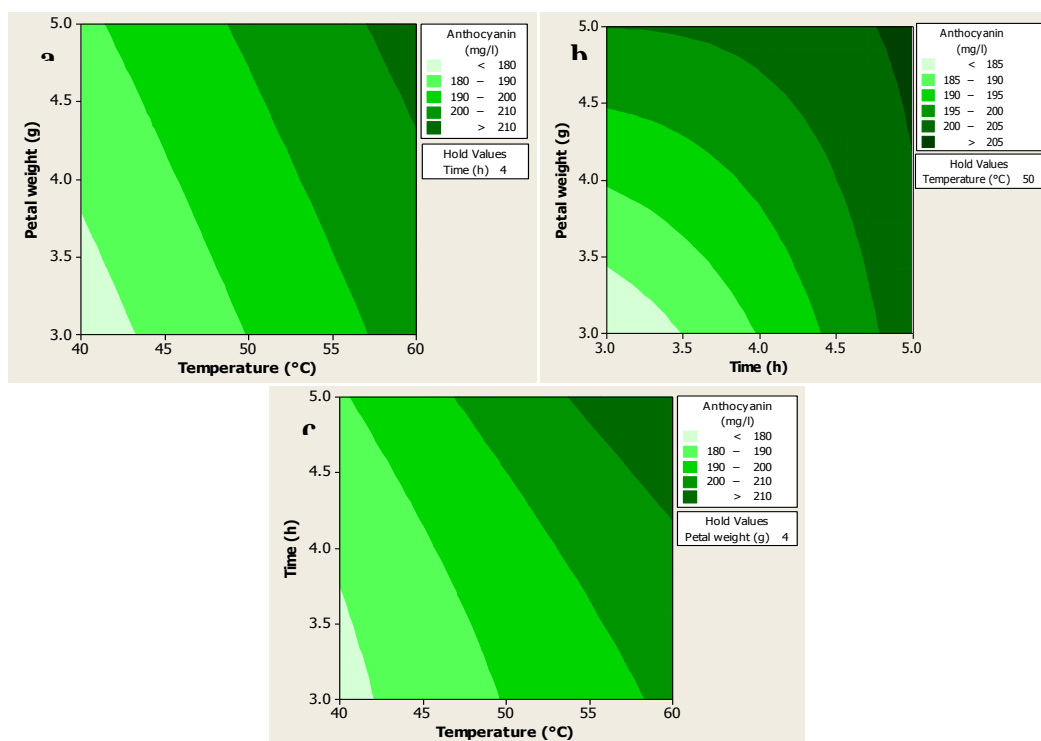
*اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵)

*Significant difference (p≤0.05)

جدول ۲- مقایسه بین میزان آنتوسیانین گلبرگ گل گاوزبان به روش آزمایشی با پیش‌بینی شده در شرایط مختلف

Table 2. Comparison between experimental and predicted anthocyanin content from *Echium Amoenum* petals under different conditions

باقی مانده Residual	راندمان استخراج پیش بینی شده (mg l ⁻¹) Predicted extraction efficiency (mg l ⁻¹)	میزان استخراج (mg l ⁻¹) Extraction efficiency (mg l ⁻¹)	وزن (گرم) Weight (g)	زمان (ساعت) Time (h)	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	تیمار Treatment
4.480	157.354	161.83	3	3	40	1
2.400	165.700	168.10	5	4	40	2
-2.459	177.292	174.83	3	5	40	3
-4.786	196.703	191.92	5	3	40	4
-0.264	197.064	196.80	3	4	40	5
0.629	200.671	201.30	5	5	40	6
-6.962	172.712	165.75	3	3	50	7
1.451	182.216	183.67	5	4	50	8
-3.332	194.965	191.63	3	5	50	9
7.026	208.107	215.13	5	3	50	10
-4.626	209.626	205.00	3	4	50	11
4.443	214.390	220.83	5	5	50	12
-0.042	186.009	185.97	3	3	60	13
1.197	196.670	197.87	5	4	60	14
3.266	210.577	213.84	3	5	60	15
0.284	217.449	217.73	5	3	60	16
-0.159	220.125	219.97	3	4	60	17
-4.547	226.047	221.50	5	5	60	18



شکل ۱- تأثیرات متقابل متغیرهای مستقل فرایند استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از گلبرگ گل گاوزبان (الف) اثر متقابل وزن گلبرگ و

دمای استخراج (ب) تأثیر متقابل وزن گلبرگ و زمان استخراج (ج) تأثیر متقابل دمای استخراج و زمان استخراج

Figure 1. Interaction effects of independent variables for anthocyanin extraction from *Echium Amoenum* petals. a) Interaction effects of extraction temperature and petal weight, b) Interaction effects of petal weight and extraction time; c) Interaction effects of extraction temperature and time

استخراج آنتوسیانین شود (۲). به طور کلی افزایش دما می‌تواند نرم‌شدن^۱ و تورم^۲ مواد را سرعت ببخشد و باعث افزایش در حلالیت مواد استخراج شده و کاهش ویسکوزیته حلال شود. به طور کلی افزایش دما باعث افزایش نفوذپذیری^۳ و حلالیت^۴ می‌شود (۹، ۱۹، ۲۳). همچنین دمای بالا با دناتورشدن پروتئین دیواره سلول‌های گیاهی، خروج آنتوسیانین از بافت گیاهی را تسهیل نموده و در نتیجه بازدهی استخراج آنتوسیانین افزایش می‌یابد. از طرف دیگر نمی‌توان آسیب‌پذیری آسان این رنگدانه در برابر حرارت‌های بالاتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد و تخریب آنتوسیانین و تبدیل آن به رنگدانه‌های پلیمری قهوه‌ای و یا بی‌رنگ و از بین رفتن رنگ مطلوب عصاره‌ها در اثر فرآیند حرارتی را نادیده گرفت (۱۷، ۲۱).

همچنین با گذشت زمان نیز میزان استخراج آنتوسیانین از نمونه گل گاوزبان افزایش پیدا کرد؛ بطوریکه در زمان ۵ ساعت میزان استخراج آنتوسیانین در بالاترین حد نسبت به سایر زمان‌ها قرار داشت. با افزایش زمان میزان بیشتری از بافت تخریب می‌شود و خروج آنتوسیانین نیز با شدت بیشتری انجام می‌پذیرد. مطابق با نتایج با افزایش نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال میزان استخراج آنتوسیانین افزایش یافت. اختلاف غلظت ماده موثره موجود در بافت گیاهی و حلال باعث استخراج مواد موثر از بافت گیاه می‌شود؛ بنابراین با افزایش اختلاف غلظت خروج مواد سریع‌تر و به مقدار بیشتری انجام می‌شود (۱۲). در تأیید نتایج حاصل از پژوهش حاضر، کومار و همکاران (۲۰۱۷) با استخراج رنگدانه بنفش قرمز از گلبرگ گل کاغذی^۵ گزارش کردند با افزایش زمان و

شکل ۱-الف اثرات متقابل وزن گلبرگ و دمای استخراج بر میزان آنتوسیانین استخراج شده از گل گاوزبان را نشان می‌دهد. با افزایش دما و نیز افزایش نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال در صورتی که زمان استخراج در نقطه مرکزی ۴ ساعت ثابت نگه‌داشته شود، میزان آنتوسیانین به صورت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) افزایش یافت (شکل ۱-الف). میزان آنتوسیانین استخراج شده در مقادیر بالاتر از ۲۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در دمای بالاتر از ۵۸ درجه سانتی‌گراد و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال بالاتر از ۴/۴ گرم در زمان ثابت ۴ ساعت مشاهده گردید. مطابق با شکل ۱-ب، با افزایش زمان استخراج و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال در شرایطی که دمای استخراج در ۵۰ درجه سانتی‌گراد (نقطه مرکزی) ثابت نگه‌داشته شود میزان آنتوسیانین استخراج شده به صورت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) افزایش یافت. مقادیر بالاتر از ۲۰۵ میلی‌گرم بر لیتر آنتوسیانین استخراج شده در مدت زمان بیشتر از ۴/۸ ساعت و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال بالاتر از ۴/۳ گرم در دمای ثابت ۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید.

مطابق با شکل ۱-ج با افزایش دما و زمان استخراج میزان آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ گل گاوزبان در شرایط ثابت نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال در نقطه مرکزی (۴ گرم) افزایش یافت. در زمان بالاتر از ۴/۳ ساعت و دمای بالاتر از ۵۵ درجه سانتی‌گراد در نسبت وزنی ثابت گلبرگ گل گاوزبان به حلال (۴ گرم) میزان آنتوسیانین استخراج شده در مقادیر بالاتر از ۲۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید.

اعمال دما یکی از عوامل مؤثر در استخراج آنتوسیانین‌ها است. افزایش دما (به دلیل کاهش ویسکوزیته دینامیکی) می‌تواند موجب افزایش قابل توجهی در ضریب انتشار و بنابراین سرعت

1. Softening
2. Swelling
3. Diffusivities
4. Solubility
5. *Bougainvillea glabra*

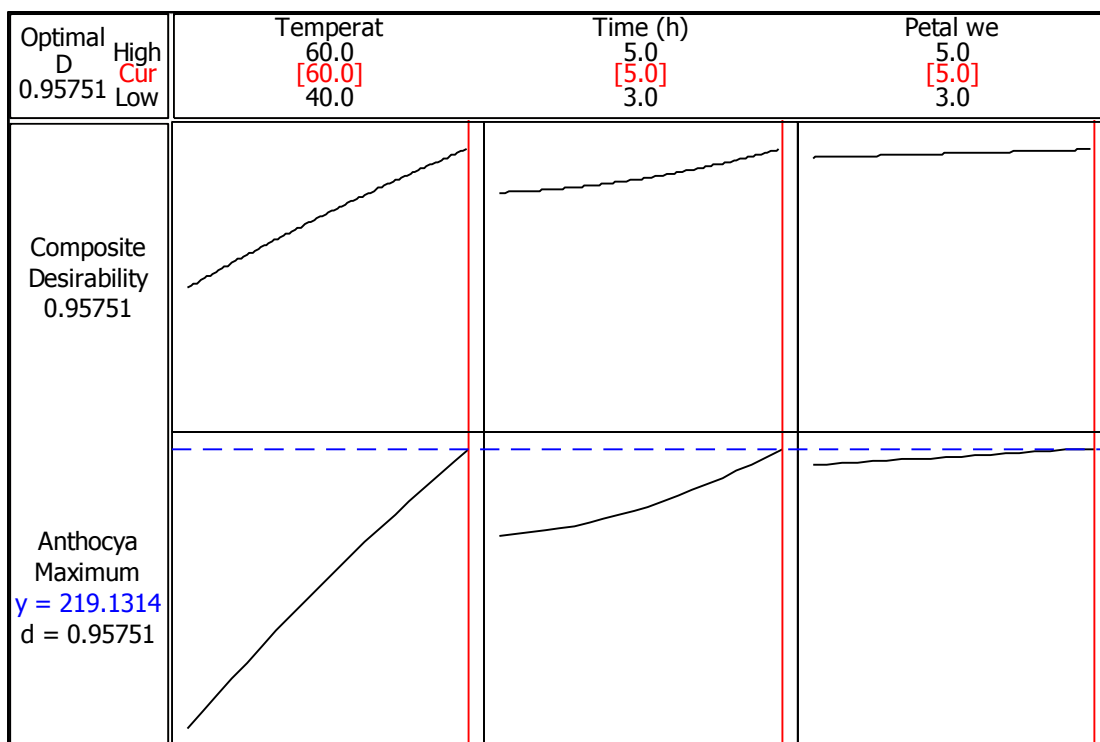
ساعت و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال ۵ گرم به عنوان شرایط بهینه تعیین گردید. تحت شرایط مذکور میزان رنگدانه آنتوسیانین معادل ۲۱۹/۱۳۱ میلی گرم بر لیتر با ۹۵/۷۵ درصد مطلوبیت پیش‌بینی گردید.

در بهینه‌سازی با استفاده از روش فاکتوریل کامل تطابق بسیار خوب مدل پیشنهادی با نقاط مورد ارزیابی ضروری می‌باشد (۷). به منظور اعتبارسنجی مدل فاکتوریل کامل بدست آمده، نمودار تطابق نتایج حاصل از مدل و داده‌های تجربی در شکل ۳ ارائه شده است. تطابق نزدیک این مقادیر نشان دهنده مطلوبیت بالای مدل پیشنهادی بود. شرایط بهینه پیش‌بینی شده در آزمایشگاه با سه تکرار به صورت عملی مورد آزمون قرار گرفت و عدم وجود اختلاف معنی‌داری بین مقدار پیش‌بینی شده و تجربی حاکی از برازش مناسب مدل پیش‌بینی شده بود. کومار و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند در شرایط بهینه استخراج رنگدانه بنفش قرمز از گلبرگ گل کاغذی شامل استفاده از ۳ گرم وزن گلبرگ، زمان ۶ ساعت و دمای ۲۲/۵ درجه سانتی‌گراد درجه مطلوبیت ۹۹/۷۶ درصد بوده است (۱۰). مهدوی خزاعی و همکاران (۲۰۱۴) مدت زمان ۲۴ ساعت، دمای ۲۵/۸ درجه سانتی‌گراد، اتانول ۲۵/۰۲ درصد و نسبت ۲۰ میلی گرم بر لیتر حلال به نمونه را به عنوان شرایط بهینه استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران گزارش نمودند (۱۲).

وزن گلبرگ‌ها نسبت به حلال میزان استخراج رنگدانه به صورت معنی‌داری افزایش یافت (۱۰). ماتتل و همکاران (۲۰۰۲) در استخراج آنتوسیانین به روش نیمه مداوم از پوست انگور قرمز نشان دادند با افزایش میزان پوست انگور قرمز میزان آنتوسیانین استخراج شده افزایش یافت (۱۳). لی و همکاران (۲۰۰۵) به بررسی میزان آنتوسیانین موجود در دیگر منابع طبیعی به روش pH افتراقی پرداختند. آنها میزان آنتوسیانین (بر حسب میلی گرم بر لیتر) در عصاره شراب قرمز^۱ را ۲۰۱/۶، عصاره تمشک^۲ ۳۳۶/۷، عصاره قره‌قات^۳ ۱۳/۶، عصاره توت سیاه^۴ ۳۰۰۶/۸ و عصاره توت فرنگی ۶۳/۶ گزارش نمودند (۱۱). کیرکا و همکاران (۲۰۰۷) میزان آنتوسیانین هویج سیاه را ۱۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن هویج تازه گزارش نمودند (۸). پدارم نیا و همکاران (۲۰۱۰) از عصاره و تفاله زرشک به میزان ۱۷۱/۲۶ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر محلول با کمک امواج فراصوت آنتوسیانین استخراج نمودند (۱۸).

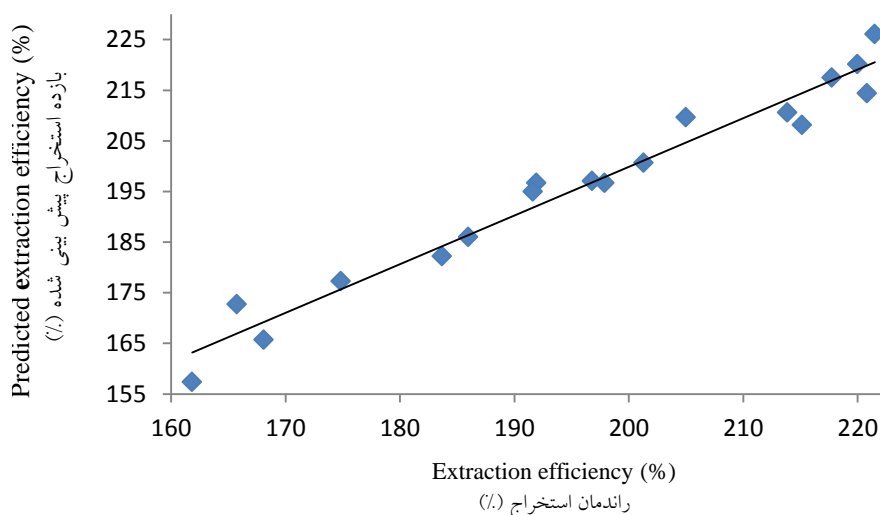
بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگدانه آنتوسیانین گلبرگ گل گاوزبان: نتایج بهینه سازی شرایط استخراج آنتوسیانین گلبرگ گل گاوزبان در شکل ۲ نشان داده شده است. به منظور دستیابی به شرایط بهینه برای به حداکثر رساندن میزان رنگدانه آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ گل گاوزبان دمای استخراج ۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۵

1. Red Wine
2. Raspberry Juice
3. Cranberry Juice Cocktail
4. Elderberry



شکل ۲- نقطه بهینه شرایط استخراج آنتوسیانین گلبرگ گل گاوزبان

Figure 2. The optimum point of anthocyanin extraction condition from *Echium Amoenum* petals



شکل ۳- تطابق نتایج حاصل از مدل و داده‌های تجربی

Figure 3. Fitting Model to experimental data

فعالی برای رنگ‌های سنتزی می‌باشند زیرا علاوه بر رنگ جذاب و درخشان بواسطه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد ویروسی برای سلامتی انسان مفید هستند. بر اساس نتایج میزان استخراج رنگدانه آنتوسیانین به میزان قابل توجهی

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر تعداد زیادی از مواد رنگزای مصنوعی بدلیل ناسالم بودن از رده مصرف خارج شده و تحقیقات پیرامون استخراج رنگدانه‌ها از منابع طبیعی افزایش یافته است. آنتوسیانین‌ها جایگزین‌های

گل گاوزبان به وزن حلال مصرفی، مدت ۵ ساعت و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تعیین شد. بنابراین شرایط مذکور برای استخراج حداکثر میزان آنتوسیانین از گلبرگ گل گاوزبان انتخاب گردید و از آن می توان در مواد غذایی به عنوان یک رنگ طبیعی با ویژگی های عملکردی مطلوب استفاده نمود.

تحت تأثیر متغیرهای مستقل فرآیند استخراج می باشند؛ بطوریکه با افزایش دمای استخراج، زمان استخراج و نسبت وزنی گلبرگ گل گاوزبان به حلال میزان آنتوسیانین استخراجی در عصاره افزایش پیدا نمود. بهترین شرایط برای استخراج آنتوسیانین موجود در گلبرگ گل گاوزبان شامل نسبت ۵ گرم گلبرگ

منابع

- Buchert, J., Koponen, J.M., Suutarinen, M., Mustranta, A., Lille, M., Törrönen, R., and Poutanen, K. 2005. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *J. Sci. Food Agri.* 85:15. 2548-2556.
- Cacace, J.E., and Mazza, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J. Food Eng.* 59:4. 379-389.
- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M., and Raghavarao, K. 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food Bioprod Process.* 90: 4. 615-623.
- Dziezak, J. D. 1987. Applications of food colorants. *Food Technol.* 41:4. 78-88.
- Fakhari, A.R., and Baghipour, S. 2009. Extraction of a food colorant from red beet and evaluation of its stability. *Journal of color science and technology.* 100: 243-250. (In Persian)
- Ghaffarzadeh, M., and Edrisi, M. 2016. A review on natural pigments and extraction methods. *J. of studies in color word,* 6:1. 63-82. (In Persian)
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J., and O'Donnell, C. P. 2015. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrason Sonochem.* 23: 308-316.
- Kirca, A., Auzkan, M., and Cemeroulu, B. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry.* 101:1. 212-218.
- Kitanovic, S., Milenovic, D., and Veljkovic, V.B. 2008. Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Biochem Eng J.* 41: 1. 1-11.
- Kumar, S.N.A., Kumar Ritesh, S., Sharmila, G., and Muthukumar, C. 2017. Extraction optimization and characterization of water soluble red purple pigment from floral bracts of *Bougainvillea glabra*. *Arab. J. Chem.* 10: 2. 52145-52150.
- Lee, J., Durst, R.W., and Wroistad, R.L. 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.
- Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S.M., Ghorbanifar, M., and Kakhki, A.H. 2014. Optimization of anthocyanin extraction in Saffron's petal with response surface methodology, *Research and Innovation in Food Science and Technology.* 3: 1. 37-50. (In Persian)
- Mantell, C., Rodriguez, M., and Martinez de la Ossa, E. 2002. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling. *Chem. Eng. Sci.* 57: 18. 3831-3838.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., and Clydesdale, F.M. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.* 45: 4. 1099-1100.
- Munawar, N., and Jamil, H.M.T. 2014. The Islamic perspective approach on plant pigments as natural food colourants. *Procedia Soc Behav Sci.* 121. 193-203.

16. Naderi Hagy Bagher candy, M., and Rezaee, M.B. 2004. Primory phytochemical investigation of *Echium amoennium*. Iranian J. of medicinal and aromatic plants research. 20: 3. 377-383. (In Persian)
17. Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C., and Tiwari, B.K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Trends Food Sci Technol. 21: 1. 3-11.
18. Pedram Niya, A., Sharifi, A., and Tvakoli Poor, H. 2010. Optimization of barberry anthocyanin extraction process in the presence of ultrasound, Journal of Food Science and Technology. 2: 1. 45-52. (In Persian)
19. Qu, W., Pan, Z., and Ma, H. 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. J. Food Eng. 99: 1. 16-23.
20. Rapisarda, P., Fanella, F., and Maccarone, E. 2000. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. J. Agric Food Chem. 48: 6. 2249-2252.
21. Rawson, A., Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P.J., and O'Donnell, C. 2011. Effect of thermo sonication on bioactive compounds in watermelon juice. Food Res Int. 44: 5. 1168-1173.
22. Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, W.H., Hew, C.S., and Ong, E.S. 2009. Pressurized hot water extraction (PHWE). J. Chromatogr. A. 1217: 16. 2484-2494.
23. Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S., and Gourdon, C. 2004. Solid Liquid Extraction of Andrographolide from Plants-Experimental Study, Kinetics Reaction and Model. Sep. Purif. Technol. 40: 2. 147-154.
24. Zare Zadeh mehrizi, R.A. Emam Jomeh, Z. Shahedi Bagh Khandan, M. Loni, E. Akhavan, H.R., and Biyabani, J. 2015. Identification and quantification of anthocyanins in pomegranate peel extract, FSCT. 12: 49. 31-40. (In Persian)
25. Zargari, A. 2006. Medicinal plants. Publications from the Ministry of Culture and Higher Education. Tehranuniv, 1010p. (In Persian)

Optimization of anthocyanin pigment extraction from *Echium Amoenum* petals by soaking and solvent method

Leila Nateghi*, Emad Yoosefi, Nazanin Zand

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Received: 2018/10/26; Accepted: 2019/10/28

Abstract

Background and objectives: Color is one of the most important factor for consumer acceptance. Pigments (natural colorants) are the safest colorants for oral use. Anthocyanins are the most important group of pigments after chlorophyll that are non-toxic, water soluble and widely present in plant cytoplasm. These flavonoid pigments are responsible for the colors of red, blue and purple in many fruits, vegetables and flowers. *Echium Amoenum* is one of the most important medicinal plants in Iran. This plant is cultivated in many parts of the world for therapeutic purposes and uses many flowers and leaves of this plant. The general objective of this research was to optimize the extraction conditions of anthocyanin pigment from the *Echium Amoenum* petals by solvent soaking (methanol/water) method.

Materials and Methods: In order to achieve the highest extraction efficiency of anthocyanin pigment from *Echium Amoenum* petals, the effects of three factors including temperature (60, 50 and 40 °C), time (3, 4 and 5 h), and the weight ratio of *Echium Amoenum* petals to the solvent (3 and 5 g) were examined. Therefore, 18 treatments were designed in accordance with a complete full factorial design. Methanol and water were mixed at 0.5:1.5 (v/v) ratio. The amount of anthocyanin extracted from each treatment was measured by differential pH method using spectrophotometer. According to the results of the tests, the best extraction conditions from *Echium Amoenum* petals were predicted with the highest anthocyanin level. Statistical analysis were done in Minitab 16 software using full factorial design.

Results: The linear effects of temperature, time and weight ratio of *Echium Amoenum* petals to the solvent on anthocyanin content were significant. Interaction and quadratic effects of temperature, time and weight ratio of *Echium Amoenum* petals on anthocyanin changes were not significant. The results showed that extracted anthocyanin content increased significantly with increasing temperature, time and weight ratio of *Echium Amoenum* petals to the solvent. Optimal conditions to extract the highest amount of anthocyanin extracts from *Echium Amoenum* petals (229.191 mg/l) were predicted at 60°C, 5 h time and 5 g weight ratio. The results showed that there was no significant difference between predicted and experimental extraction conditions.

Conclusion: By replacing conventional synthetic colorants with natural one, food manufacturers could take a positive step towards producing healthy food with high safety level. Full factorial design is a useful way to predict the pigments extraction conditions from plants.

Keywords: *Echium Amoenum*, Anthocyanin, Extraction, Optimization.

*Corresponding author; leylanatheghi@iauvaramin.ac.ir; leylanatheghi@yahoo.com