

Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from Saffron Petals Using Ultrasound and Cold Plasma Pretreatment

Hadi Hashemi¹, Yas Kohansal², Mohammad-Taghi Golmakani³,
Armin Mirzapour-Kouhdasht⁴, Marco Garcia-Vaquero⁵, Fatemeh Ghiasi^{1*}

¹ Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, Email: fatemehghiasi@shirazu.ac.ir

² Master Graduate, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

³ Professor, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

⁴ Assistant Professor, Department of Chemical Sciences, SSPC, Science Foundation Ireland Research Centre for Pharmaceuticals, Bernal Institute, University of Limerick, Castletroy, Limerick, V94 T9PX, Ireland

⁵ Professor, Section of Food and Nutrition, School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland

Article Info

Article type:

Research Full Paper

Article history:

Received: 2025-05-30

Revised: 2025-08-21

Accepted: 2025-09-15

Keywords:

Saffron petal extract

Cold plasma

Ultrasound

Antioxidant properties

ABSTRACT

Background and Objective: Saffron petals are one of the main by-products of saffron processing that are produced on a large scale and, despite the presence of abundant active compounds, are discarded and have not been used in the production of commercial value-added products. Since saffron petals are a cheaper source for extracting bioactive compounds with effective clinical effects compared to saffron stigma, this study aimed to investigate the effect of cold plasma pretreatment and then ultrasound-assisted extraction of saffron petal extract on the functional properties of the extract.

Materials and Methods: In this study, the response surface methodology was used to design the experiment and 11 treatments with two independent variable including petal to solvent ratio (1, 3.5 and 6%) and ethanol concentration (0, 15 and 30%) were investigated for extraction and the parameters of free radical scavenging rate, total phenol content, total flavonoid content, total anthocyanin content, extraction yield and dry matter of saffron petal extract were measured. Then, the extraction process was optimized using Design Expert software.

Results: The results showed that the petal to solvent ratio and the ethanol concentration had a significant effect on the functional properties of the extract, and the actual equation of the effect of extraction variables on these properties was determined and reported. In general, with increasing the petal to solvent ratio, the total phenol and total flavonoid contents in the extract decreased. Increasing the amount of ethanol in the solvent also had a negative effect on the total phenol and total flavonoid contents of the extract. In contrast, with increasing the petal to solvent ratio, the amount of total anthocyanin in the extract increased. Concerning the quadratic effect of the ethanol concentration, an increase followed by a

decrease in the amount of total anthocyanin was observed. The study of the antioxidant properties through the free radical scavenging activity, also showed an initial decrease and then an increasing trend with increasing the quadratic effect of the petal to solvent ratio of the extract. However, increasing the ethanol concentration always had a positive effect on the antioxidant properties of the extract. Based on the results of software extraction optimization, the best petal to solvent ratio and ethanol concentration were 1.00% and 18.58%, respectively. Under optimal conditions, the total phenol content was 265.52 mg/100 g, the total flavonoid content was 122.04 mg/100 g, the total anthocyanin content was 33.99 mg/100 g, the free radical scavenging was 62.66%, the extraction yield was 0.49%, and the dry matter content was 0.67%.

Conclusion: The results of this study showed that saffron petals, as a by-product of saffron processing, can be extracted under appropriate ultrasound-assisted extraction conditions in an ideal time to produce an extract with added value and high biological properties that can be used in functional food formulations, as well as in the production of pharmaceutical supplements and cosmetic-health products.

Cite this article: Hadi Hashemi, Yas Kohansal, Mohammad-Taghi Golmakani, Armin Mirzapour-Kouhdasht, Marco Garcia-Vaquero, Fatemeh Ghiasi. 2025. Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from Saffron Petals Using Ultrasound and Cold Plasma Pretreatment. *Food Processing and Preservation Journal*, 17(3), 111-136.



© The Author(s)



[10.22069/fppj.2025.23716.1883](https://doi.org/10.22069/fppj.2025.23716.1883)

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از گلبرگ زعفران با استفاده از فراصوت و پیش‌ تیمار پلاسمای سرد

هادی هاشمی^۱، یاس کهنسال^۲، محمدتقی گلمکانی^۳، آرمین میرزاپور کوهدشت^۴،
مارکو گارسیا واکوئرو^۵، فاطمه غیائی^{۱*}

^۱ استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، رایانامه: fatemehghiasi@shirazu.ac.ir

^۲ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۳ استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

^۴ استادیار، بخش علوم شیمی، SSPC، بنیاد علوم ایرلند، مرکز تحقیقات داروسازی، موسسه برنال، دانشگاه لیمریک، کسلتری، لیمریک، V94 T9PX، ایرلند

^۵ استاد، بخش غذا و تغذیه، دانشکده کشاورزی و علوم غذایی، کالج دانشگاهی دوبلین، بلفیلد، دوبلین، ایرلند

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: گلبرگ زعفران یکی از محصولات جانبی اصلی فرآوری زعفران می‌باشد که در مقیاس وسیعی تولید شده و علیرغم وجود ترکیبات موثره فراوان آن، دور ریخته شده و در تولید محصولات تجاری با ارزش افزوده از آن استفاده نشده است. از آنجایی که گلبرگ زعفران در مقایسه با کلاله زعفران منبع ارزان‌تری برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال با اثرات بالینی موثر است، هدف از این پژوهش بررسی اثر پیش تیمار پلاسمای سرد و سپس استخراج عصاره گلبرگ زعفران به کمک امواج فراصوت بر ویژگی‌های عملکردی عصاره بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۹ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۴	مواد و روش‌ها: در این پژوهش از روش سطح پاسخ برای طراحی آزمایش استفاده شده و ۱۱ تیمار شامل نسبت گیاه به حلال (۱، ۳/۵ و ۶ درصد) و غلظت‌های مختلف اتانول در آب (۰، ۱۵ و ۳۰ درصد) جهت استخراج استفاده شد و فراسنجه‌های میزان فنول کل، میزان فلاونوئید کل، میزان آنتوسیانین کل، پتانسیل مهار رادیکال‌های آزاد، راندمان استخراج و ماده خشک عصاره گلبرگ زعفران اندازه‌گیری شد. سپس بهینه‌سازی فرآیند استخراج به کمک نرم افزار دیزاین اکسپرت انجام شد.
واژه‌های کلیدی: عصاره گلبرگ زعفران پلاسمای سرد امواج فراصوت خاصیت آنتی‌اکسیدانی	یافته‌ها: نتایج نشان داد نسبت گیاه به حلال و درصد اتانول حلال تاثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های عملکردی عصاره داشته و معادله‌ی واقعی تاثیر پارامترهای استخراج بر این ویژگی‌ها تعیین و گزارش شد. به شکل کلی با افزایش میزان گیاه در حلال میزان فنول کل و فلاونوئید کل عصاره کاهش پیدا کرده است. افزایش میزان اتانول موجود در حلال نیز تاثیر منفی بر میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره داشته است. در مقابل، با افزایش میزان گیاه در حلال میزان آنتوسیانین کل عصاره افزایش پیدا کرده است. در ارتباط با تاثیر توان دوم غلظت اتانول، افزایش و به دنبال آن کاهش در مقدار آنتوسیانین کل مشاهده شد. مطالعه میزان خواص

آنتی اکسیدانی از طریق فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد نیز ابتدا کاهش و سپس روند افزایشی را با افزایش توان دوم تاثیر نسبت گیاه در حلال عصاره نشان داد. گرچه، افزایش غلظت اتانول همواره تاثیر مثبتی بر میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره داشت. براساس نتایج بهینه‌سازی استخراج با نرم افزار، بهترین نسبت گیاه به حلال و غلظت اتانول به ترتیب ۱/۰۰ درصد و ۱۸/۵۸ درصد بوده است. در شرایط بهینه، میزان فنول کل ۲۶۵/۵۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم، میزان فلاونوئید کل ۱۲۲/۰۴ میلی گرم در ۱۰۰ گرم، میزان آنتوسیانین کل ۳۳/۹۹ میلی گرم در ۱۰۰ گرم، میزان مهار رادیکال‌های آزاد ۶۲/۶۶ درصد، راندمان استخراج معادل ۰/۴۹ درصد و ماده خشک ۰/۶۷ درصد گزارش شد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد گلبرگ زعفران به عنوان یک محصول جانبی فرآوری زعفران می‌تواند تحت شرایط مناسب استخراج به کمک فراصوت در مدت زمان ایده‌آلی منجر به تولید عصاره‌ای با ارزش افزوده و خواص بیولوژیک بالا شود که قابلیت استفاده در فرمولاسیون‌های مواد غذایی فراسودمند، همچنین تولید مکمل‌های دارویی و محصولات آرایشی بهداشتی مورد استفاده قرار گیرد.

استناد: هاشمی، هادی؛ کهنسال، یاس؛ گلمکانی، محمدتقی؛ میرزاپور کوهدشت، آرمین؛ گارسیا واکوئرو، مارکو؛ غیائی، فاطمه. (۱۴۰۴). بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از گلبرگ زعفران با استفاده از فراصوت و پیش تیمار پلاسمای سرد. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۷(۳)، ۱۱۱-۱۳۶.



[10.22069/fppj.2025.23716.1883](https://doi.org/10.22069/fppj.2025.23716.1883)

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



مقدمه

کلاله زعفران (*Crocus sativus*) از دیرباز به عنوان ماده دارویی و افزودنی غذایی مورد توجه بوده است. امروزه مکمل‌هایی بر پایه ترکیبات زیست فعال زعفران از جمله کروسین و سافرانال به عنوان یکی از موثرترین مکمل‌های دارویی در سراسر دنیا گسترش یافته‌اند (۱). متأسفانه، دسترسی کم و قیمت بالای کلاله زعفران سبب شده این محصولات تجاری قیمت بالایی داشته باشند. از سوی دیگر، فرآوری زعفران همراه با تولید مقدار زیادی فرآورده‌های جانبی است که عموماً بدون استفاده دور ریخته می‌شوند. گلبرگ‌های گیاه زعفران، محصول جانبی اصلی فرآوری زعفران است که سالانه در مقادیر زیادی برداشت می‌شود. برای مثال، فقط در ایران، سالانه حدود ۳۹۶۰ تن گلبرگ خشک شده تولید می‌شود (با سطح زیر کشت حدود ۱۱۰۰۰ هکتار، نرخ تولید حدود ۳۶ کیلوگرم در هکتار) که حدود ۸۰ درصد پسماند زیستی گل را تشکیل می‌دهد (۲، ۳). تحقیقات نشان داده گلبرگ زعفران به عنوان یکی از ضایعات فراوری زعفران، دارای ترکیبات زیست فعال فراوانی از جمله کامپفرول و کروسین است (۴) که خاصیت ضد دیابت، کاهش دهنده امراض کلیوی، ضد درد و ضد استرس از آنها گزارش شده است (۵، ۶). همچنین، عصاره گلبرگ زعفران دارای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی فراوانی است که خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی به این عصاره بخشیده است (۷). با توجه به اینکه گلبرگ‌های زعفران در مقایسه با کلاله آن هم ارزانتر هستند و هم در مقیاس وسیعتری در دسترس هستند، از این رو می‌توانند جایگزین خوبی برای کلاله گران قیمت، به ویژه در استخراج اجزای فعال زیستی برای کاربردهای تجاری باشند. با این حال، عوامل متعددی از جمله دما، نور، رطوبت و pH تأثیر زیادی بر تخریب مواد اصلی زیست فعال

گلبرگ زعفران طی استخراج عصاره دارد. بنابراین، به دلیل عدم پایداری و حساسیت به شرایط فرآوری و شرایط محیطی در زمان نگهداری، استفاده از این ترکیبات با حفظ ویژگی‌های زیستی در فرمولاسیون-های غذایی، دارویی و مکمل‌ها چالش برانگیز است (۷).

روش‌های استخراج مرسوم معمولاً از نظر زمان، عملکرد انتخابی، مصرف حلال و انرژی ناکارآمد هستند (۸). از این رو، فناوری‌های جدید با صرفه‌جویی در انرژی سبز مانند استخراج به کمک مایکروویو^۱ (MAE)، استخراج به کمک اولتراسوند^۲ (UAE) و استخراج به کمک اهمیک^۳ (OHA) در استخراج اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان و گیاهان دارویی متعدد توسعه یافته‌اند. این استراتژی‌های جدید در مقایسه با روش‌های مرسوم دارای مزایایی چون کاهش زمان، انرژی مصرفی، دمای استخراج و در مقابل افزایش کارایی، انتخاب پذیری و تکرارپذیری در استخراج و حفظ بهتر ویژگی‌های زیست فعال عصاره‌ها همراه هستند (۹، ۱۰). در استخراج به کمک اهمیک، یک جریان الکتریکی متناوب مستقیماً از مواد غذایی عبور می‌کند که منجر به تولید یک مقاومت الکتریکی ذاتی در مواد غذایی و متعاقباً انرژی حرارتی حجمی با نرخ‌های فوق‌العاده سریع می‌شود (۱۱). استخراج با فراصوت بر اساس تشکیل پدیده کاویتاسیون در زمان استفاده از امواج فراصوت با فرکانس بالا در یک مخلوط حاوی گیاهان توسعه یافته است (۱۲). در زمینه استخراج عصاره از گلبرگ زعفران با روش‌های جدید، پژوهش‌های محدودی صورت گرفته است که در هر یک تأثیر برخی پارامترهای مختلف در استخراج بررسی شده است. به‌طور مثال، در پژوهشی ارزیابی استخراج به کمک

¹ Microwave assisted extraction

² Ultrasound assisted extraction

³ Ohmic heating assisted extraction

مایکروویو با استفاده از روش سطح پاسخ، به منظور دستیابی به ترکیبات با ارزش افزوده بالا از گلبرگ‌های زعفران انجام شد. برای بهینه‌سازی متغیرهای فرآیند شامل دما، زمان و غلظت حلال اتانول، از طراحی مرکب مرکزی استفاده شد. عصاره‌ها از نظر محتوای کل فنول و فلاونوئید، و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن و ظرفیت مهار رادیکال هیدروکسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقادیر بیشینه به دست آمده به ترتیب عبارت بودند از: $126/20 \pm 2/99$ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم ماده خشک، $8/05 \pm 0/11$ میلی گرم کاتچین در هر گرم ماده خشک، 246 ± 6219 میکرومول TEAC در هر گرم ماده خشک، و 205 ± 3131 میکرومول TEAC در هر گرم ماده خشک. نتایج نشان دادند که شرایط بهینه استخراج، ترکیبی از دمای پایین (۲۵ درجه سلسیوس)، زمان استخراج بالا (۵ دقیقه) و استفاده از اتانول (۱۰۰٪) به عنوان حلال بود (۱۳). در مطالعه دیگر، استخراج ترکیبات زیست‌فعال از گلبرگ‌های زعفران با استفاده از روش سنتی آب داغ^۱ (CHW) و سه روش نوآورانه استخراج از طریق گرمایش به کمک امپیک (OHAE)، استخراج به کمک امواج فراصوت (UAE) و استخراج به کمک مایکروویو (MAE)، از نظر مصرف انرژی، بازده و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. بهینه‌سازی فرآیند با استفاده از روش سطح پاسخ نشان داد که شرایط بهینه استخراج به ترتیب برای OHAE، MAE و UAE شامل ۴۵ دقیقه و ۲۲۵ ولت، ۴/۲۵ دقیقه و ۵۰۰ وات، و ۴۰/۶۱ دقیقه و ۱۵۳/۳ وات بود. تحت این شرایط بهینه، مقادیر فنول کل در عصاره‌های حاصل از روش‌های OHAE، MAE، UAE و CHW به ترتیب برابر با ۹۲۸، ۸۶۹، ۸۶۳ و ۷۲۱ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم بود؛ مقدار فلاونوئید کل نیز به ترتیب

برابر با ۱۴۸، ۱۱۵، ۱۳۰ و ۱۰۱ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم، و مقدار آنتوسیانین کل به ترتیب ۲۳۸، ۲۰۶، ۲۰۵ و ۱۸۹ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم گزارش شد. مقادیر IC₅₀ برای عصاره‌ها در شرایط بهینه به ترتیب برای روش‌های OHAE، MAE، UAE و CHW برابر با ۱۷۸، ۲۲۶، ۳۳۵ و ۵۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود. عصاره‌های حاصل از روش OHAE بیشترین فعالیت ضد میکروبی و بیشترین توان مهار آنزیم لپاز را از خود نشان دادند. بر اساس تحلیل جامع داده‌ها، روش OHAE به عنوان یک روش بهینه توصیه می‌شود، چرا که عصاره‌هایی با بیشترین میزان ترکیبات زیست‌فعال را در زمان استخراج مناسب فراهم می‌آورد (۱).

از سوی دیگر پیش‌تیمار گیاهان برای استخراج عصاره و اسانس روش کارآمدی جهت افزایش راندمان استخراج گزارش شده است. در این میان، تکنولوژی پلاسما به عنوان پیش‌تیمار در استخراج مواد زیست‌فعال از گیاهان توجه بسیاری از محققان در صنعت غذا را به خود جذب کرده است. پلاسما سرد یک فناوری نوین فرآوری غیرحرارتی مواد غذایی است که از طریق تحریک گاز فرآیندی (دی‌اکسیدکربن، اکسیژن، نیتروژن، هلیوم، آرگون، یا هوا) با میدان الکتریکی قوی در دمای محیط تولید می‌شود. مطالعات پیشین نشان داده است که استفاده از پلاسما به عنوان پیش‌تیمار در فرآیند استخراج عصاره و اسانس از گیاهانی نظیر نعناع، سیب چوبی و سبوس برنج به کمک فراصوت می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بازده استخراج، مقادیر فنول و فلاونوئید شود (۱۴-۱۸).

بر این اساس، هدف از این پژوهش بررسی تاثیر درصد اتانول و نسبت‌های مختلف پودر گلبرگ زعفران به حلال بر روند استخراج عصاره از گلبرگ‌های پیش‌تیمار شده با پلاسما به کمک اولتراسوند بود. بدین منظور، اثر تیمارها بر

¹ Conventional hot water

داخل پلاستیک پلی اتیلنی همراه گاز نیتروژن بسته بندی و توسط پلاسما (NIK Plasma Tech., Tehran, Iran) به مدت ۱۰ ثانیه و ولتاژ ۱۱ کیلو ولت با فاصله حدودی ۴ سانتی‌متر تیمار شدند.

استخراج عصاره: به منظور استخراج عصاره گلبرگ زعفران، ابتدا مقدار مشخصی از پودر گلبرگ با حلال مد نظر در ظرف مخصوص دستگاه فراصوت (SONOPULS ultrasonic homogenizer, HD3200, electronic GmbH & Co., 150W, 20kHz, Bandelin Berlin, Germany) ریخته شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه (۱۲۰ ثانیه روشن ۴۰ ثانیه خاموش) تحت فرآیند قرار گرفت. عصاره استخراج شده صاف شده و تا کاربردهای بعدی در فریزر با دمای منفی ۱۸ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱). با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) با استفاده از Design Expert 11، یک طرح مرکب مرکزی (CCD) شامل ۱۱ اجرای آزمایشی شامل ۳ بار تکرار در نقطه مرکزی بر اساس جدول ۱ طراحی شد.

فراسنجه‌های میزان فنول کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل عصاره گلبرگ، ظرفیت مهار رادیکال آزاد، راندمان استخراج، و میزان ماده خشک عصاره استخراج شده بود. در نهایت بهینه‌سازی شرایط استخراج به کمک روش سطح پاسخ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: گلبرگ زعفران از مزارع منطقه اقلید استان فارس تهیه شد. سایر مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی از شرکت‌های مرک آلمان و سیگمای آمریکا تهیه شدند.

اصلاح پودر گلبرگ به کمک پلاسما: ابتدا گلبرگ‌های بنفش زعفران از سایر قسمت‌ها جدا شده و در سایه خشک شد. سپس گلبرگ‌ها به کمک دستگاه آسیاب پودر و الک شد. گلبرگ‌های پودر شده

جدول ۱- مقادیر واقعی متغیرهای مستقل در ۱۱ تیمار مورد استفاده در استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ

Table 1- Real value of independent variables in 11 treatments used in extraction using response surface methodology.

فاکتور Factor	تیمار Treatment	واحد Unit	پایین‌ترین مقدار Minimum	بالا‌ترین مقدار Maximum	میانگین Average
A	نسبت گلبرگ (P): حلال (S) Petal (P): Solvent (S) Ratio		1:99	6:94	3.5:96.5
B	غلظت اتانول Ethanol concentration	%	0	30	15

غلظت ۷/۵ درصد به محلول اضافه و مخلوط به مدت ۱ ساعت در یک مکان تاریک قرار گرفت. میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و مقادیر محتوای فنلی از طریق منحنی کالیبراسیون ($y = 0.0132x + 0.0645$; $R^2 = 0.9489$) تهیه شده با یک سری استانداردهای گالیک اسید (۲۵، ۵۰، ۱۰۰

اندازه‌گیری میزان فنول کل: میزان فنول کل توسط روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. نمونه عصاره رقیق شده (۳۰ برابر) (۰/۳۰ میلی‌لیتر) با ۰/۷۵ میلی-لیتر معرف فولین سیوکالتیو (۱۰ w/v٪ در آب مقطر) مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شد. سپس ۰/۷۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم با

میکروگرم بر میلی‌لیتر) تعیین شد. نتایج به صورت میلی گرم معادل اسیدگالیک در هر ۱۰۰ گرم نمونه بیان شد (۱۹).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش شهبازی و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه (۴ برابر رقیق شده) با ۰/۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط شده و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شده و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرتستین (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به عنوان نمودار استاندارد ($y = 0.0115x + 0.0263; R^2 = 0.9993$) استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین کل: میزان آنتوسیانین کل با استفاده از روش هاشمی و همکاران در سال ۲۰۲۰ اندازه‌گیری شد. برای این اندازه‌گیری، از دو بافر پتاسیم کلراید ۰/۰۲۵ مولار با pH ۱ و سدیم استات ۰/۴ مولار با pH حدود ۴/۵ استفاده شد. ابتدا ۰/۴ میلی‌لیتر نمونه (۴ برابر رقیق شده) با ۰/۴ میلی‌لیتر از بافرها مخلوط شده و جذب در ۵۱۰ و ۷۰۰ خوانده شد و جذب کل از فرمول زیر بدست آمد (رابطه ۱).

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}$$

برای اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین کل (TCA) از روش زیر استفاده شد (رابطه ۲).

رابطه (۲)

$$\text{میزان آنتوسیانین کل} = \frac{(A \times M_W \times DF \times 100)}{M_A}$$

A میزان جذب، M_W میزان وزن مولکولی (۴۴۹/۲)، DF ضریب رقت (۱۰)، M_A قابلیت جذب سیانیدین-۳ گلوکوزید (۲۶/۹۰۰) است.

اندازه‌گیری ظرفیت مهار رادیکال آزاد: میزان مهار رادیکال‌های آزاد (RSA) به وسیله ۲، ۲ دی فیل - ۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۶۶ میلی‌لیتر از هر نمونه با غلظت یکسان ۰/۰۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ mM DPPH مخلوط شد. محلول در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در یک مکان تاریک نگهداری و جذب در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۹). میزان مهار رادیکال‌های آزاد با رابطه ۳ محاسبه شد.

رابطه (۳)

میزان مهار رادیکال‌های آزاد (درصد)

$$= \left[\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

A_{sample} و A_{control} به ترتیب میزان جذب کنترل و نمونه را نشان می‌دهند.

اندازه‌گیری ماده خشک: ماده خشک عصاره‌ها با خشک کردن نمونه‌ها در آون با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس برای رسیدن به وزن ثابت و پس سرد کردن در دمای اتاق به مدت حدود ۲۰ دقیقه ارزیابی شد.

اندازه‌گیری راندمان عصاره‌گیری: محتوای جامد کل عصاره‌های به‌دست‌آمده برای تعیین بازده استخراج به روش وزنی اندازه‌گیری شد. ۵ گرم عصاره یک شبانه روز در آون در دمای ۵۵ درجه سلسیوس خشک شد. سپس قبل از توزین به مدت ۶۰ دقیقه در دسیکاتور سرد شد. بازده استخراج نمونه با استفاده از رابطه ۴ تعیین شد. (۱):

رابطه (۴)

وزن عصاره بعد از ((= راندمان استخراج (درصد)

$$100 \times ((\text{وزن اولیه عصاره}) / (\text{خشک کردن}))$$

آنالیز آماری: بهینه‌سازی داده‌ها برای استخراج با استفاده از فراصوت و پیش‌ تیمار پلاسمای سرد با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) با استفاده از Design Expert 11 انجام شد. در فرآیند بهینه‌سازی، طراحی تجربی و تحلیل رگرسیون بعدی داده‌های

تجربی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری مدل درجه دوم برای ارزیابی تحلیل واریانس (ANOVA) انجام شد. کیفیت معادله مدل چند جمله‌ای از نظر آماری با توجه به ضریب تعیین (R^2) توجیه شد و اهمیت آماری آن با استفاده از روش آزمون F محاسبه شد.

نتایج و بحث

به‌طور کلی روش استفاده از حلال معمولی ترین روش مورد استفاده در استخراج از عصاره‌های گیاهی می‌باشد. متغیرهای متعددی از جمله زمان استخراج، دمای فرآیند، نسبت گیاه به حلال و نوع حلال می‌توانند فعالیت بیولوژیکی و عملکرد عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. عموماً با توجه به پیچیدگی ساختار گیاهان و خواص ترکیبات زیست فعال و ترکیب مواد استخراج شده، روش عمومی جهت

استخراج موجود نیست (۲۰). جدول ۲ میزان فنول کل، میزان آنتوسیانین کل، میزان فلاونوئید کل، میزان مهار رادیکال آزاد، راندمان استخراج، و ماده خشک عصاره‌های استخراج شده در غلظت‌های ۱ تا ۶ درصد گیاه در حلال و غلظت اتانول ۰ تا ۳۰ درصد را نشان می‌دهد. همان گونه که از نتایج مشخص است، میزان فنول کل نمونه‌ها در محدوده ۱۹۶ تا ۳۷۱ میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه، میزان آنتوسیانین کل در محدوده ۲۶ تا ۴۱ میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه، میزان فلاونوئید کل در محدوده ۸۱ تا ۱۴۵ میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه، میزان مهار رادیکال‌های آزاد در محدوده ۵۴/۹۱ تا ۶۳/۱۱ درصد، راندمان استخراج در محدوده ۰/۵۰ تا ۲/۲۹ درصد و ماده خشک در محدوده ۰/۶۶ تا ۳/۷۹ درصد اندازه‌گیری شد.

جدول ۲- میزان فنول کل، میزان آنتوسیانین کل، میزان فلاونوئید کل، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد، راندمان استخراج، و ماده خشک عصاره‌ها.

Table 2. Total phenol content, total anthocyanin content, total flavonoid content, free radical scavenging activity, extraction efficiency, and dry matter of the extracts.

Run	Petal (P): Solvent (S) Ratio (A)	غلظت اتانول (%) Ethanol concentration (%) (B)	TPC* (mg/100 g) فنول کل (mg/100 g)	TAC (mg/100 g) آنتوسیانین کل (mg/100 g)	RSA (%) مهار رادیکال آزاد (%)	Y (%) راندمان استخراج (%)	DM (%) ماده خشک (%)	TFC (mg/100 g) فلاونوئید کل (mg/100 g)
1	1:99	15	251.10	32.40	62.77	0.55	0.67	111.20
2	3.5: 96.5	0	307.96	32.73	54.91	1.67	2.29	101.11
3	3.5: 96.5	30	255.68	29.72	59.07	1.41	2.25	99.03
4	6: 94	15	219.30	39.68	61.73	1.87	3.73	87.55
5	3.5: 96.5	15	271.50	36.54	58.58	1.58	2.26	84.07
6	1: 99	0	371.59	26.85	55.15	0.61	0.69	109.46
7	3.5: 96.5	15	230.68	41.61	57.97	1.39	2.29	105.64
8	3.5: 96.5	15	237.50	41.15	56.01	1.44	2.23	105.29
9	6: 94	30	196.59	33.67	58.58	1.86	3.65	81.20
10	1: 99	30	267.05	30.09	63.11	0.50	0.66	145.29
11	6: 94	0	214.77	34.40	56.74	2.29	3.79	103.55

*TPC (total phenol content), TAC (total anthocyanin content), RSA (radical scavenging activity), Y (yield), DM (dry matter), TFC (total flavonoid content).

در پاسخ میزان فنول کل عصاره را نشان می‌دهد. همان گونه که از نتایج مشخص است، میزان پودر گلبرگ

تأثیر متغیرهای استخراج بر میزان فنول کل عصاره:
جدول ۳ نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل

نتایج حاصل از این تحقیق (شکل ۱-الف) نشان دادند که کاهش غلظت حلال (اتانول) منجر به افزایش مقادیر فنول کل می‌شود (۲۴). بر اساس گزارشات پیشین این امر به وجود ترکیبات فنولی آبدوست در این گیاه مرتبط بود. نتایجی مشابه در مقاله‌ای با موضوع بررسی اثر نسبت ماده جامد به حلال در استخراج به کمک فراصوت (دما ۴۰ درجه سلسیوس، زمان ۶۰ دقیقه، غلظت اتانول ۵۰٪) از باقی مانده بلوبری، بر روی مقادیر آنتوسیانین، فنول و فلاونوئید کل گزارش شده است (۲۵). طبق این نتایج با افزایش میزان حلال در فرآیند استخراج، میزان فنول کل به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. محققان این اتفاق را به افزایش سطح تماس بین گیاه و حلال در نسبت‌های پایین تر جامد به مایع ربط داده‌اند که منجر به افزایش انتقال جرم ترکیبات محلول از ماده گیاهی به حلال می‌شود. به عبارت دیگر، کاهش فنول کل با افزایش نسبت گیاه به حلال مربوط به ویسکوزیته بالای محلول است که باعث دشوار شدن فرآیند حفره‌زایی توسط امواج فراصوت می‌شود. چراکه با افزایش نسبت جامد به حلال، چرخه کاهش فشار باید در برابر نیروی چسبندگی قوی‌تری عمل کند. معادله واقعی شبیه‌سازی تاثیر متغیرهای مستقل بر میزان فنول کل عصاره در ادامه نمایش داده شده است. ماهیت حلال پارامتر بحث برانگیزی است که بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد. حلالیت ترکیبات فنولی به شدت به نوع حلال مورد استفاده، درجه پلیمریزاسیون فنول‌ها و تعامل فنول‌ها با سایر مواد تشکیل دهنده و ساختار ترکیبات غیر محلول بستگی دارد (۲۰). سیستم‌های حلالی با قطبیت کم، مانند آب-اتانول و آب-متانول، معمولاً برای استخراج ترکیبات فنولی از مواد گیاهی خشک استفاده می‌شود (۲۶، ۲۷). در مطالعه‌ای برای استخراج ترکیبات فنولی از برگ‌های زیتون، تأثیر زمان، نسبت حلال-جامد،

نسبت به مقدار حلال و غلظت حلال اتانول تأثیر معنی‌داری بر میزان فنول کل عصاره‌ها داشته است. بر اساس شکل ۱-ب با افزایش میزان گیاه به حلال میزان فنول کل عصاره کاهش پیدا کرده است. همچنین غلظت حلال اتانول تأثیر منفی بر میزان فنول کل عصاره داشته و با افزایش غلظت اتانول، میزان فنول کل عصاره‌ها کاهش یافته است. نتایج مشابه در پژوهشی نشان داد با افزایش غلظت اتانول از ۲۰-۶۰٪ میزان فنول کل عصاره حاصل از پوست درخت کاج قرمز (*Pinus densiflora*) به طور معنی‌داری از ۲۶۶/۰۵ به ۱۷۱/۳۸ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره کاهش یافت (۲۱). همچنین نتایج حاصل از پژوهشی نشان داد که افزایش غلظت اتانول بیشتر از ۴۰٪ در استخراج به کمک امواج فراصوت از گیاه *Polyscias fruticosa* لزوماً باعث افزایش میزان فنول کل نشد. محققین این اتفاق را به افزایش قطبیت محلول آبی اتانول در نتیجه کاهش غلظت اتانول نسبت دادند (۲۲). در این شرایط محلول حاوی غلظت پایین تر اتانول دارای قطبیت متوسط می‌باشد که می‌تواند باعث افزایش حلالیت ترکیبات فنولی در عصاره حاصله شود. همچنین کاهش ویسکوزیته حلال بواسطه حضور آب بیشتر و قطبیت مناسب منجر به آزاد شدن بیشتر ترکیبات فنولی در عصاره می‌شود. نتایج مشابه در پژوهشی دیگر نشان داد که نسبت بالاتر آب به حلال در استخراج از گیاه *Corchorus olitorius* به کمک فراصوت باعث افزایش بازده استخراج ترکیبات فنولی کل می‌شود (۲۳). این اثر به دلیل اختلال در پیوند بین مواد محلول و ماتریکس گیاهی ربط داده شده، که باعث تورم بیشتر مواد سلولی شده و استخراج ترکیبات فنولی را بهبود می‌بخشد. همچنین مطالعه‌ای به بهینه‌سازی پارامترهای استخراج (دما، زمان و غلظت حلال) از گیاه *Clitoria ternatea* پرداخته است.

غلظت اتانول و دما بررسی شد. در این پژوهش زمان در ۴ سطح (۱۰ تا ۵۰ ساعت)، نسبت حلال به جامد در ۳ سطح (۲۰٪، ۳۰٪ و ۴۰٪)، درصد غلظت اتانول در ۴ سطح (۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درصد) و دما در ۳ سطح (۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شرایط مطلوب به منظور استخراج ترکیبات فنولی کل از برگ‌های زیتون در مدت زمان ۲۰ ساعت، دمای ۴۰ درجه سلسیوس، نسبت حلال-جامد ۱:۳۰ و اتانول ۸۰ درصد است. در این پژوهش افزایش نسبت حلال به ماده جامد باعث افزایش مقادیر ترکیبات فنولی حاصل در عصاره شد که این پیامد همراستا با اصول انتقال جرم بود که طبق

آن با افزایش نسبت حلال به جامد باعث افزایش گرادیان غلظت به عنوان نیروی محرک در فرآیند انتقال جرم میان فاز جامد و حجم کلی مایع، می‌شود (۲۸). برای پاسخ میزان فنول کل با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم به صورت رابطه (۵) بدست آمد و ضریب همبستگی ۰/۸۶ بود.

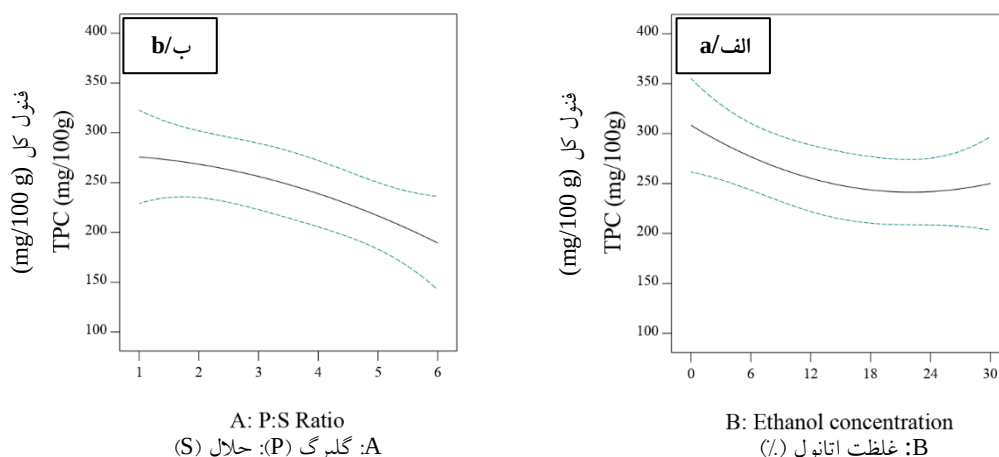
رابطه (۵)

$$\text{TPC} = + 368.674 - 8.493 \times \text{P:S Ratio} - 8.102 \times \text{Ethanol concentration} + 0.576 \times \text{P:S Ratio} \times \text{Ethanol concentration} - 2.488 \times \text{P:S Ratio}^2 + 0.138 \times \text{Ethanol concentration}^2$$

جدول ۳- آنالیز واریانس برای مطالعه معنی‌داری متغیرهای مدل بر پاسخ میزان فنول کل

Table 3- Analysis of variance to study the significance of model variables on total phenol content response

منبع Source	جمع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	مقدار F F-value	مقدار P p-value	
مدل Model	20744.62	5	4148.92	6.37	0.0316	معنی دار Significant
نسبت گلبرگ (P): حلال (S) A-P:S Ratio	11186.45	1	11186.45	17.18	0.0090	معنی دار Significant
غلظت اتانول-B B-Ethanol concentration	5104.17	1	5104.17	7.84	0.0380	معنی دار Significant
AB	1864.67	1	1864.67	2.86	0.1514	
A ²	612.47	1	612.47	0.9405	0.3767	
B ²	2445.44	1	2445.44	3.76	0.1104	
باقی مانده Residual	3256.14	5	651.23			
عدم برازش Lack of Fit	2299.94	3	766.65	1.60	0.4064	غیر معنی دار not significant
خطای خالص Pure Error	956.20	2	478.10			
Cor Total	24000.76	10				



شکل ۱- نمودار اثر غلظت اتانول (الف) و نسبت گلبرگ به حلال (ب) بر میزان فنول کل نمونه‌های عصاره گلبرگ زعفران
Figure 1. Effect of ethanol concentration (a) and petal to solvent ratio (b) on total phenol content of saffron petal extract samples

مشخص است (جدول ۴) میزان پودر گلبرگ زعفران پیش‌تیمار شده با پلاسما نسبت به حلال و کنش متقابل غلظت حلال اتانول و میزان پودر در حلال تاثیر معنی‌داری بر میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها داشته است. تاثیر کنش متقابل میزان اتانول حلال و گیاه در حلال نشان داد که در نسبت‌های پایین گیاه در حلال و غلظت بالای اتانول میزان فلاونوئید بیشتری استخراج شده است (شکل ۲-الف). بر اساس شکل ۲-ب با افزایش میزان گیاه در حلال میزان فلاونوئید کل عصاره کاهش پیدا کرده است پژوهش مشابه بر روی میزان فنول کل و میزان فلاونوئید کل عصاره حاصل از استخراج گیاه *Corchorus olitorius* به کمک امواج فراصوت بر مبنای روش سطح پاسخ با متغیرهای زمان، دما، غلظت حلال (اتانول) و نسبت حلال به ماده جامد انجام شد (۲۳). نتایج حاصل از نمودار سه بعدی تاثیر برهم‌کنش غلظت اتانول و نسبت حلال به ماده جامد نشان داد که میزان فلاونوئید کل عصاره با افزایش میزان حلال به گیاه (نسبت‌های پایین گیاه) و غلظت بالای اتانول، بهبود یافت. درصد اتانول در این مقاله از ۶۰ تا ۸۰ درصد و نسبت حلال به ماده جامد از ۳۰ تا ۵۰ میلی‌لیتر به

تاثیر متغیرهای استخراج بر میزان فلاونوئید کل عصاره: فلاونوئیدها یکی از ترکیبات زیر شاخه‌های مواد فنلی در تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی گیاهان می‌باشند. این ترکیبات گروه بزرگی از فنول‌ها با ساختار بنزوپیرون هستند و به طور فراوان در سبزی‌ها و میوه‌ها وجود دارند. فلاونوئیدها بیشتر مسئول رنگ، طعم، جلوگیری از اکسیداسیون چربی و خواص فیزیولوژیکی در گیاهان هستند (۲۹). ویژگی‌های شیمیایی فلاونوئیدها بیشتر به ساختار و میزان پلیمریزاسیون آنها بستگی دارد. تنوع فلاونوئیدها به عوامل مختلفی از جمله تنوع و میزان قرار گرفتن در معرض نور خورشید بستگی دارد و تا به امروز بیش از ۵۰۰۰ ترکیب فلاونوئیدی شناسایی شده است (۳۰). فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات گیاهی با وزن مولکولی پایین دسته بندی می‌شوند (۳۱). این ترکیبات همچنین به عنوان مکمل برای سلامت و رشد انسان مصرف می‌شوند (۳۲). این ترکیبات اغلب نقش بهبود سلامت را در مطالعات آزمایشگاهی و واقعی نشان می‌دهند. جدول ۴ نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در پاسخ میزان فلاونوئید کل عصاره را نشان می‌دهد. همان گونه که از نتایج

ازای هر گرم پودر گزارش شد. افزایش فلاونوئید کل عصاره با افزایش غلظت اتانول تا ۶۰ درصد به توانایی اتانول به عنوان یک حلال شناخته شده برای استخراج این نوع ترکیبات بواسطه برهم زدن پیوندهای بین ترکیبات محلول و ماتریکس گیاهی نسبت داده شد. در حالی که افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره حاصله با افزایش نسبت اتانول به ماده جامد از ۱۰ تا ۳۰ میلی‌لیتر در واحد گرم به افزایش سطح تماس بین حلال و نمونه که موجب بهبود انتقال جرم و در نتیجه، افزایش انحلال پذیری این نوع ترکیبات نسبت داده شده است. معادله واقعی شبیه‌سازی تاثیر متغیرهای مستقل بر میزان فلاونوئید کل عصاره در رابطه ۶ نمایش داده شده است. به منظور افزایش استخراج فلاونوئیدها، مطالعات فراوانی با استفاده از امواج فراصوت انجام شده است. در مطالعه‌ای استخراج فلاونوئیدها به کمک دستگاه فراصوت از برگ‌های گیاه مورینگا انجام شد. نتایج نشان دادند که افزایش نسبت حلال به ماده جامد (از ۱۰ تا ۴۰ میلی‌لیتر حلال به ازای هر گرم پودر) و افزایش غلظت اتانول از ۲۰ تا ۴۰٪ باعث افزایش میزان فلاونوئید عصاره شد. هم چنین برهم کنش دو متغیر نسبت حلال به پودر و غلظت اتانول به طور معنی‌داری بر میزان فلاونوئید کل اثر گذار بودند (۳۳). گزارشی در زمینه بهبود فرآیند استخراج به کمک امواج فراصوت برای استخراج فلاونوئیدها از پوسته بادام زمینی نیز منتشر شده است که اثر پارامترهایی مانند غلظت اتانول، اندازه ذره، نسبت حلال به ماده

جامد، دما و قدرت دستگاه بر روی حلالیت فلاونوئیدها بررسی کرده است. این پژوهش نشان داد که با افزایش نسبت حلال به پودر، بازدهی استخراج فلاونوئیدها از ۷/۵۱۶ به ۹/۲۶۳ میلی‌گرم در هر گرم افزایش یافت (۳۴). در پژوهشی دیگری نیز مشاهده شد که استفاده از حلال اتانول با توجه به قطبیت ترکیبات فلاونوئیدی، حلال مناسبی برای استخراج عصاره کرفس است. گاهی ترکیب حلال‌های مختلف اثر بهتری بر استخراج ترکیب‌های فعال دارد. گزارش شده است که ترکیبات فلاونوئیدی در حلال ترکیبی آب و اتانول بهتر استخراج می‌شوند (۳۵). معمولاً آب به عنوان متورم کننده بافت گیاهی عمل کرده در حالی که حلال اتانول شکننده پیوند مواد محلول و ماتریکس گیاهی است (۳۶). همچنین آب دارای ثابت الکترونیک بالایی است و با غلظت‌های مختلف اتانول منجر به قطبیت‌های متفاوتی می‌شود (۳۷). نتایج مطالعه حاضر نیز تاکیدکننده تاثیر معنی دار غلظت اتانول و نسبت آن به گیاه بود.

برای پاسخ میزان فلاونوئید کل با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم به صورت رابطه (۶) بدست آمد و ضریب همبستگی ۰/۸۶ بود.

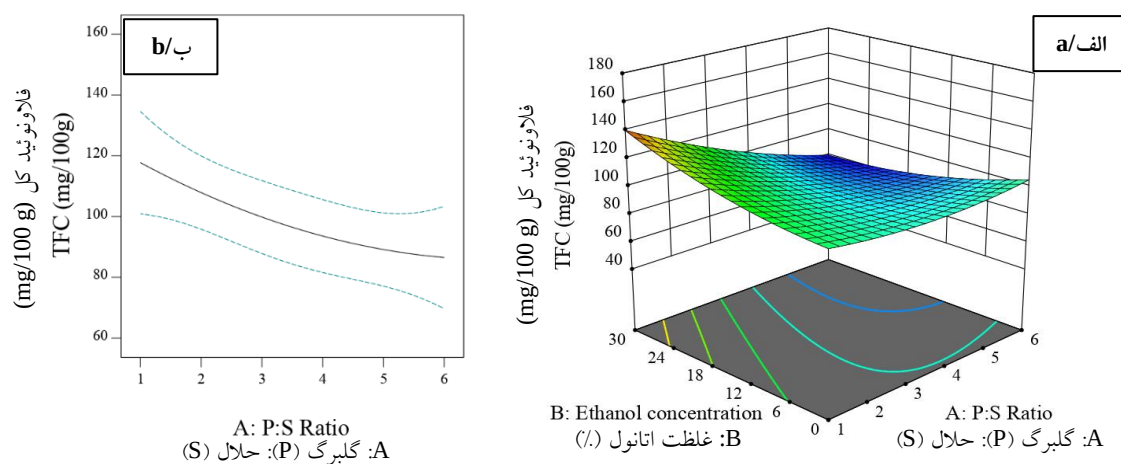
رابطه (۶)

$$\begin{aligned} \text{TFC} = & + 113.512 - 6.759 \times \text{P:S Ratio} + \\ & 0.637 \times \text{Ethanol concentration} - 0.388 \times \\ & \text{P:S Ratio} \times \text{Ethanol concentration} + 0.905 \\ & \times \text{P:S Ratio}^2 + 0.028 \times \text{Ethanol} \\ & \text{concentration}^2 \end{aligned}$$

جدول ۴- آنالیز واریانس برای مطالعه معنی داری متغیرهای مدل بر پاسخ میزان فلاونوئید کل

Table 4. Analysis of variance to study the significance of model variables on total flavonoid content response

منبع Source	جمع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	مقدار F F-value	مقدار P p-value	
مدل Model	2578.87	5	515.77	6.10	0.0345	معنی دار Significant
A- (S) نسبت گلبرگ (P): حلال	1461.79	1	1461.79	17.30	0.0088	معنی دار Significant
A-P:S Ratio غلظت اتانول-B B-Ethanol concentration	21.63	1	21.63	0.2559	0.6344	
AB	846.05	1	846.05	10.01	0.0250	معنی دار Significant
A ²	81.00	1	81.00	0.9586	0.3725	
B ²	102.15	1	102.15	1.21	0.3216	
باقی مانده Residual	422.49	5	84.50			
عدم برازش Lack of Fit	117.37	3	39.12	0.2564	0.8536	غیر معنی دار not significant
خطای خالص Pure Error	305.12	2	152.56			
Cor Total	3001.35	10				



شکل ۲- نمودار سه بعدی اثر متقابل غلظت اتانول و نسبت گلبرگ به حلال (الف) و اثر نسبت گلبرگ به

حلال (ب) بر میزان فلاونوئید کل نمونه‌های عصاره گلبرگ زعفران

Figure 2. 3D diagram of the interaction of ethanol concentration and petal to solvent ratio (a) and the effect of petal to solvent ratio (b) on the total flavonoid content of saffron petal extract samples

مستقل در پاسخ میزان آنتوسیانین کل عصاره را نشان می‌دهد. همان گونه که از نتایج مشخص است توان

تأثیر متغیرهای استخراج بر میزان آنتوسیانین کل عصاره: جدول ۵ نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای

دوم غلظت حلال و میزان گیاه نسبت به حلال تاثیر معنی‌داری بر میزان آنتوسیانین کل عصاره‌ها داشته است. نتایج نشان دادند که تاثیر توان دوم میزان اتانول حلال ابتدا میزان آنتوسیانین کل را افزایش و سپس کاهش داده است (شکل ۳-الف). همچنین بر اساس شکل ۳-ب با افزایش میزان گیاه در حلال میزان آنتوسیانین کل عصاره افزایش پیدا کرده است. در استخراج آنتوسیانین از *Hibiscus sabdarifa* L. به کمک فراصوت، گزارش شده است که کاهش مقادیر آنتوسیانین کل در عصاره با افزایش نسبت حلال، به دلیل ناپایداری و اکسید شدن بخشی از محتوای آنتوسیانینی عصاره در غلظت‌های بالاتر حلال است (۳۸). همچنین پژوهشی به بهینه‌سازی استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران به کمک اسید سیتریک به عنوان حلال، توسط روش سطح پاسخ پرداخت. در این پژوهش در یک دمای ثابت، کاهش نسبت حلال به پودر گلبرگ از ۶۰ تا ۱۰ میلی‌لیتر در هر گرم منجر به افزایش ۸۰ درصدی آنتوسیانین شد که دلیل آن به کاهش نسبت وزن ماده اولیه در حجم حلال و کم شدن غلظت در نسبت‌های بالاتر حلال به پودر گلبرگ، نسبت داده شده بود. علاوه بر این، در پژوهشی با هدف بهینه‌سازی استخراج آنتوسیانین از پوست *Dacryodes rostrata*، نتایج به طور مشابهی نشان داد که با کاهش میزان حلال نسبت به ماده جامد (از ۱۰۰ میلی‌لیتر در گرم به ۱۰ میلی‌لیتر در گرم) مقادیر آنتوسیانین از ۸۷/۹۷ به ۴۵۶/۹۱ میلی‌گرم معادل

سیانیدین-۳-گلوکوزید در هر گرم افزایش می‌یابد (۳۹).

در ارتباط با تاثیر غلظت اتانول حلال، نتایجی مشابه در استخراج به کمک فراصوت از باقی‌مانده بلوبری گزارش شده است. طبق این نتایج، افزایش غلظت اتانول از ۱۰ تا ۵۰٪ باعث افزایش مقدار آنتوسیانین کل شده، در حالی که افزایش بیشتر غلظت اتانول (تا ۹۰٪) منجر به کاهش آن شده است. در واقع اتانول منجر به کاهش ثابت دی‌الکتریک حلال آبی می‌شود و باعث تسهیل انتشار آنتوسیانین عصاره خواهد شد. با این وجود، غلظت‌های بالای اتانول ممکن است منجر به کم آبی سلول گیاهی و به دنبال آن کاهش انتشار مولکول‌ها از ماتریکس گیاهی شود. به طور کلی رابطه غیرخطی بین غلظت اتانول و محتوای آنتوسیانین در استخراج به کمک امواج فراصوت در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است (۴۱، ۴۰) که این امر اهمیت بهینه‌سازی غلظت حلال در فرآیند استخراج را آشکار می‌سازد. به طور مثال، گزارش شده است که با افزایش غلظت اتانول از ۲۲ تا ۲۶ گرم در هر ۱۰۰ گرم، بازده استخراج آنتوسیانین از باقی‌مانده انار ابتدا افزایش و سپس با افزایش بیشتر غلظت اتانول کاهش می‌یابد. این امر به ثابت دی‌الکتریک کمتر اتانول نسبت به آب و در نتیجه جذب کمتر انرژی فراصوت و کاهش اثر فراصوت مربوط می‌شود. معادله واقعی شبیه‌سازی تاثیر متغیرهای مستقل بر میزان آنتوسیانین کل عصاره در رابطه ۷ نمایش داده شده است.

جدول ۵- آنالیز واریانس برای مطالعه معنی داری متغیرهای مدل بر پاسخ میزان آنتوسیانین کل

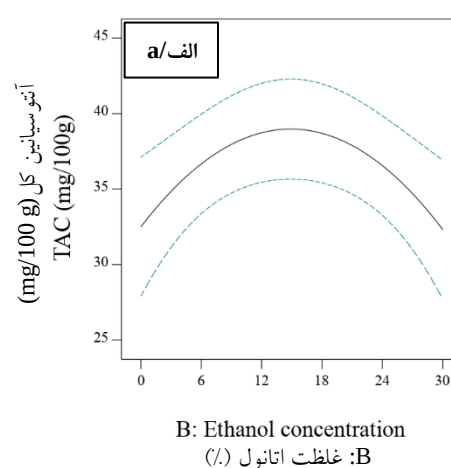
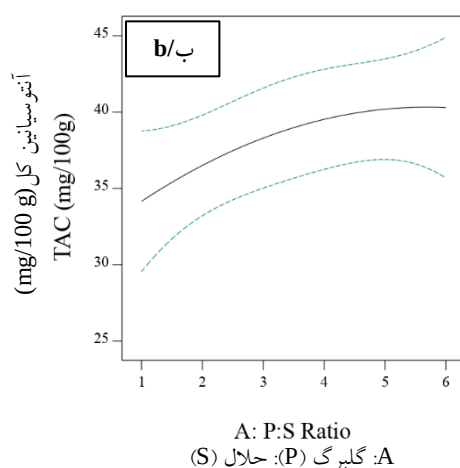
Table 5- Analysis of variance to study the significance of model variables on total anthocyanin content response

منبع Source	جمع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	مقدار F F-value	مقدار P p-value	
مدل Model	203.41	5	40.68	6.45	0.0309	معنی دار Significant
نسبت گلبرگ (P): حلال (S) A-P:S Ratio	56.62	1	56.62	8.97	0.0303	معنی دار Significant
غلظت اتانول-B B-Ethanol concentration	0.0476	1	0.0476	0.0075	0.9342	
AB	3.88	1	3.88	0.6152	0.4683	
A ²	7.82	1	7.82	1.24	0.3163	
B ²	109.29	1	109.29	17.32	0.0088	معنی دار Significant
باقی مانده Residual	31.56	5	6.31			
عدم برازش Lack of Fit	15.81	3	5.27	0.6696	0.6453	غیر معنی دار not significant
خطای خالص Pure Error	15.74	2	7.87			
Cor Total	234.96	10				

رابطه (۷)

$$\begin{aligned} \text{TAC} = & + 23.375 + 3.591 \times \text{P:S Ratio} + \\ & 0.962 \times \text{Ethanol concentration} - 0.026 \times \text{P:S} \\ & \text{Ratio} \times \text{Ethanol concentration} - 0.281 \times \text{P:S} \\ & \text{Ratio}^2 - 0.029 \times \text{Ethanol concentration}^2 \end{aligned}$$

برای پاسخ میزان آنتوسیانین کل با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم به صورت رابطه (۷) بدست آمد و ضریب همبستگی ۰/۸۷ بود.



شکل ۳- اثر توان دوم غلظت اتانول (الف) و نسبت گلبرگ به حلال (ب) بر میزان آنتوسیانین کل نمونه‌های عصاره گلبرگ زعفران
Figure 3. The quadratic effect of ethanol concentration (a) and the effect of petal to solvent ratio (b) on the total anthocyanin content of saffron petal extract samples

عصاره ابتدا کاهش و سپس افزایش پیدا کرده است. نتایجی مشابه در استخراج به کمک فراصوت از باقی‌مانده بلوبری نیز گزارش شده است، که در آن با افزایش غلظت اتانول از ۱۰ تا ۵۰ درصد، روند افزایشی در درصد مهار رادیکال آزاد مشاهده شده است (۲۵). مطالعه‌ای در زمینه بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Ascophyllum nodosum* با استفاده از روش سطح پاسخ نیز نشان داد که با افزایش غلظت اتانول، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نیز به دلیل بیشتر شدن سطح تماس ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و حلال، افزایش می‌یابد (۳۰).

تأثیر متغیرهای استخراج بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد: جدول ۶ نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در پاسخ میزان مهار رادیکال‌های آزاد عصاره را نشان می‌دهد. همان گونه که از نتایج مشخص است غلظت اتانول حلال و توان دوم میزان گیاه در حلال تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد عصاره‌ها داشته است. طبق شکل ۴-الف میزان اتانول حلال تأثیر مثبتی بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد عصاره داشته و با افزایش میزان اتانول میزان مهار رادیکال‌های آزاد عصاره‌ها افزایش یافته است. همچنین بر اساس شکل ۴-ب با افزایش توان دوم تأثیر میزان گیاه در حلال، میزان مهار رادیکال‌های آزاد

جدول ۶- آنالیز واریانس برای مطالعه معنی‌داری متغیرهای مدل بر پاسخ میزان مهار رادیکال‌های آزاد

Table 6. Analysis of variance to study the significance of model variables on radical scavenging activity response

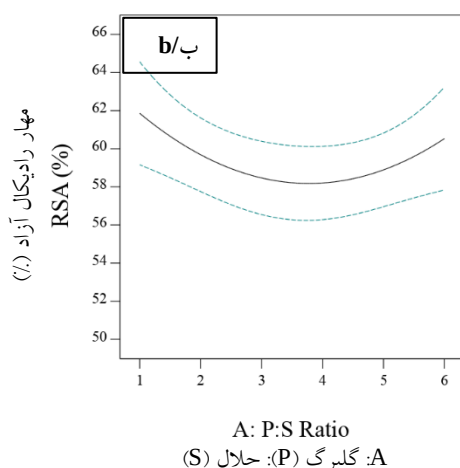
منبع Source	جمع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean Square	مقدار F F-value	مقدار P p-value	
مدل Model	73.05	5	14.61	6.73	0.0283	معنی‌دار Significant
نسبت گلبرگ (P): A- (S) حلال A-P:S Ratio غلظت اتانول-B B-Ethanol concentration	2.64	1	2.64	1.22	0.3203	
AB	32.49	1	32.49	14.96	0.0118	معنی‌دار Significant
A ²	9.39	1	9.39	4.32	0.0922	
B ²	22.53	1	22.53	10.37	0.0234	معنی‌دار Significant
باقی مانده Residual	13.16	1	13.16	6.06	0.0571	
باقی مانده Residual	10.86	5	2.17			
عدم برازش Lack of Fit	7.24	3	2.41	1.34	0.4551	غیر معنی‌دار not significant
خطای خالص Pure Error	3.61	2	1.81			
Cor Total	83.91	10				

شده است (۱۳، ۴۲، ۴۳). معادله واقعی شبیه سازی تاثیر متغیرهای مستقل بر خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره در رابطه ۸ نشان داده شده است.

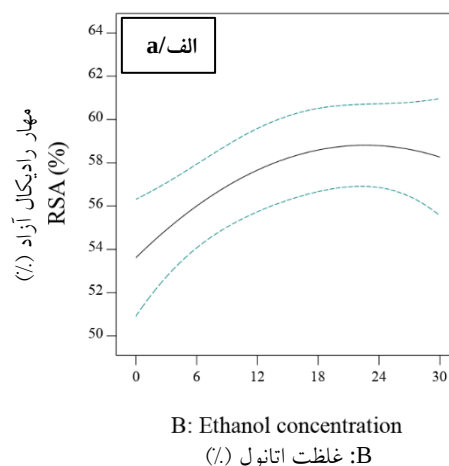
برای پاسخ میزان مهار رادیکال های آزاد با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم به صورت رابطه (۸) بدست آمد و ضریب همبستگی ۰/۸۷ بود.

رابطه (۸)

$$\begin{aligned} \text{RSA} = & +58.240 - 2.992 \times \text{P:S Ratio} \\ & +0.602 \times \text{Ethanol concentration} - 0.041 \times \\ & \text{P:S Ratio} \times \text{Ethanol concentration} + 0.477 \\ & \times \text{P:S Ratio}^2 - 0.010 \times \text{Ethanol} \\ & \text{concentration}^2 \end{aligned}$$



همانطور که مشاهده می شود در این پژوهش روند تغییرات مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت اتانول در حلال با روند تغییرات فنول و فلاونوئید کل با افزایش غلظت اتانول هم راستا نبودند. دلیل این امر می تواند مربوط به وجود ترکیبات ضد اکسیدانی مانند کاروتنوئیدها و توکوفرول ها، بتاکاروتن و لیکوپن باشد که در اکثر گیاهان یافت می شوند، اما توسط آزمون های انجام شده در این پژوهش قابل شناسایی نبودند. همچنین روش اندازه گیری مهار رادیکال آزاد در این پژوهش با استفاده از DPPH، فقط امکان اندازه گیری ترکیبات فنولی آبگریز را فراهم می سازد. مشابه این نتایج در پژوهش های پیشین نیز گزارش



شکل ۴- اثر غلظت اتانول (الف) و توان دوم نسبت گلبرگ به حلال (ب) بر میزان مهار رادیکال های آزاد نمونه های عصاره گلبرگ زعفران

Figure 4. The effect of ethanol concentration (a) and the quadratic effect of petal to solvent ratio (b) on the radical scavenging activity rate of saffron petal extract samples

مستقیم ساختار داخلی شبکه نمونه را تغییر می دهند (۴۶). گزارش شده است که انرژی فراصوت می تواند حفره ها و کانال میکروسکوپی در داخل گیاه ایجاد نماید که به به خروج بیشتر عصاره از گیاه کمک خواهد کرد. ایجاد حفره ها و میکروکانال ها، سطح تماس ترکیبات زیست فعال و حلال را بیشتر می کند و در نتیجه انتقال جرم افزایش می یابد (۴۷). جدول ۷ نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در پاسخ

تاثیر متغیرهای استخراج بر میزان راندمان استخراج عصاره: فرآیند استخراج با امواج فراصوت شامل مکانیسم های منفرد یا ترکیبی شامل مکانیسم های احتمالی نظیر تکه تکه شدن، فرسایش مویئنگی و تخریب بافت (۴۴) است. اثرات ترکیبی این مکانیسم ها، عملکرد امواج فراصوت را از طریق اختلالات سلولی و افزایش انتقال جرم افزایش می دهد (۴۵). این اثرات همچنین به طور مستقیم یا غیر

مار سبز (*Clinacanthus nutans*) به دنبال افزایش غلظت اتانول از ۱۰ درصد به ۳۰ درصد، از طریق خیساندن و با کمک روش سطح پاسخ گزارش شده است که علت این اتفاق، تورم در سلول های گیاه به دنبال افزایش میزان آب در سیستم استخراج می باشد که باعث افزایش سطح تماس بین گیاه و حلال شده و در نتیجه افزایش راندمان استخراج را به دنبال داشت (۴۲). علاوه بر این، نتایج حاصل از پژوهشی مبتنی بر استخراج مواد زیست فعال از محصولات جانبی بادمجان به کمک ماکروویو نشان داد که با افزایش آب در حلال (به عبارتی کاهش غلظت حلال)، موادی غیر از مواد زیست فعال (نظیر کربوهیدرات و پروتئین) نیز ممکن است استخراج شوند که باعث افزایش بازدهی استخراج نهایی شوند. معادله واقعی شبیه سازی تاثیر متغیرهای مستقل بر راندمان استخراج عصاره در رابطه ۹ نمایش داده شده است.

میزان راندمان استخراج عصاره را نشان می دهد. همان گونه که از نتایج مشخص است توان دوم نسبت گیاه به حلال (شکل ۵-الف)، نسبت گیاه به حلال (شکل ۵-ب) و غلظت اتانول (شکل ۵-ث) تاثیر معنی داری بر میزان راندمان استخراج عصاره ها داشته است. بر اساس شکل ۵ با افزایش میزان گیاه در حلال، میزان راندمان استخراج عصاره نیز به شدت افزایش پیدا کرده است. نتایج مشابه در استخراج تانن از *Intsia bijuga* گزارش شد (۴۸). در این مقاله با افزایش میزان ماده جامد نسبت به حلال در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، بازدهی استخراج از حدود ۵۰ تا ۷۰٪ افزایش یافت. مطابق با شکل ۵، میزان درصد اتانول در حلال تاثیر منفی بر میزان راندمان استخراج عصاره داشته و با افزایش میزان اتانول راندمان استخراج عصاره ها کاهش یافته است. در مطالعه ای با نتایج مشابه، شامل کاهش راندمان استخراج عصاره از علف

جدول ۷- آنالیز واریانس برای مطالعه معنی داری متغیرهای مدل بر پاسخ میزان راندمان استخراج

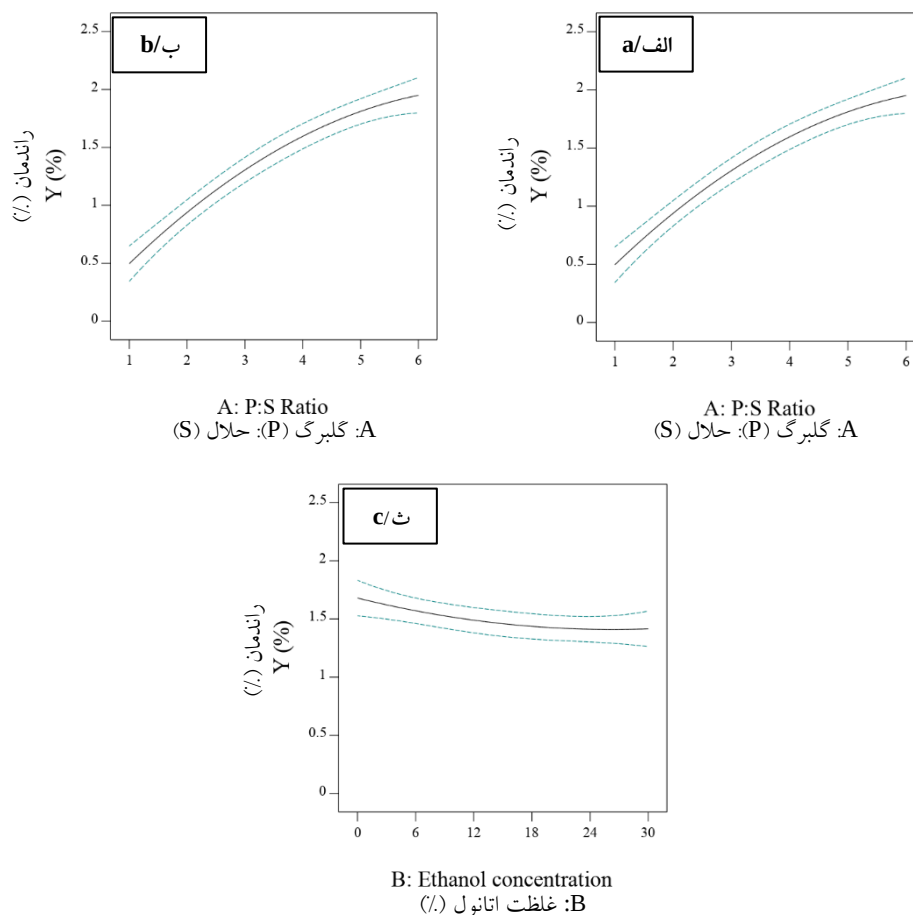
Table 7 - Analysis of variance to study the significance of model variables on extraction yield response

منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P	
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
مدل	3.45	5	0.6890	99.14	< 0.0001	معنی دار
Model						Significant
نسبت گلبرگ (P): حلال (S) A-P:S Ratio	3.17	1	3.17	456.17	< 0.0001	معنی دار
A-P:S Ratio						Significant
غلظت اتانول B-Ethanol concentration	0.1053	1	0.1053	15.16	0.0115	معنی دار
B-Ethanol concentration						Significant
AB	0.0256	1	0.0256	3.68	0.1132	
A ²	0.1422	1	0.1422	20.46	0.0063	معنی دار
B ²	0.0196	1	0.0196	2.82	0.1541	
باقی مانده	0.0348	5	0.0070			
Residual						
عدم برازش	0.0146	3	0.0049	0.4840	0.7272	غیر معنی دار
Lack of Fit						not significant
خطای خالص	0.0201	2	0.0101			
Pure Error						
Cor Total	3.48	10				

$$Y = 0.086 + 0.588 \times \text{P:S Ratio} - 0.0131 \times \text{Ethanol concentration} - 0.002131826666667 \times \text{P:S Ratio} \times \text{Ethanol concentration} - 0.038 \times \text{P:S Ratio}^2 + 0.00039 \times \text{Ethanol concentration}^2$$

برای پاسخ بازده با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم به صورت رابطه (۹) بدست آمد و ضریب همبستگی ۰/۹۹ بود.

رابطه (۹)

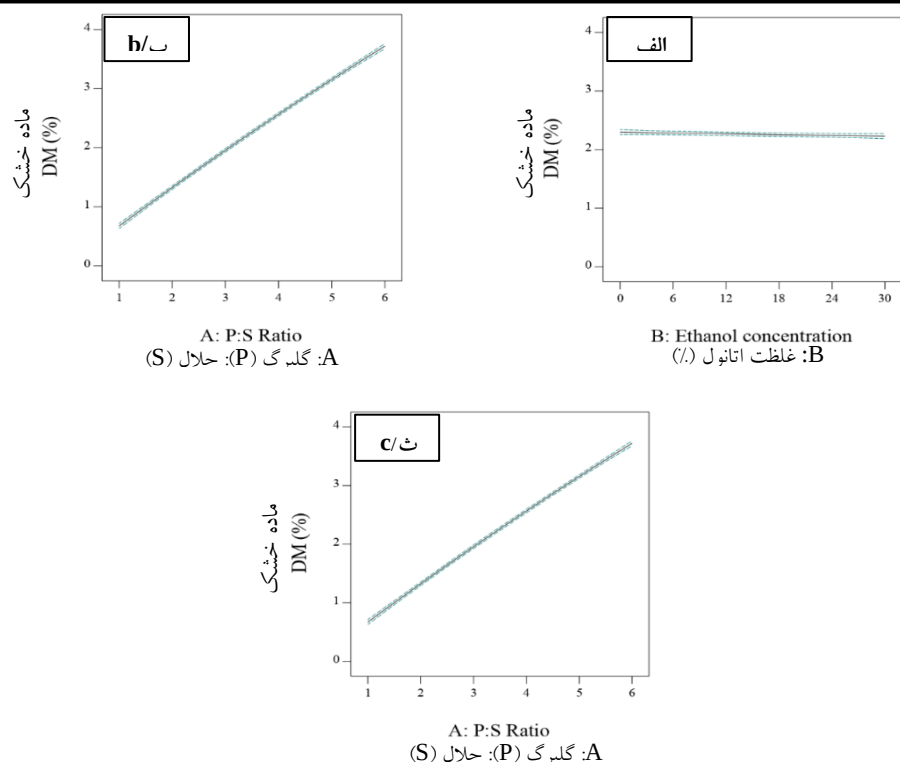


شکل ۵- اثر توان دوم نسبت گلبرگ به حلال (الف)، اثر نسبت گلبرگ به حلال (ب) و غلظت اتانول (ث) بر راندمان استخراج عصاره نمونه‌های عصاره گلبرگ زعفران

Figure 5. Quadratic effect of petal to solvent ratio (a), effect of petal to solvent ratio (b), and ethanol concentration (c) on the extraction yield of saffron petal extract samples

داشته و با افزایش میزان اتانول، ماده خشک عصاره‌ها کاهش یافته است. در مقابل، با افزایش میزان گیاه در حلال، میزان ماده خشک عصاره نیز به شدت افزایش پیدا کرده است. (شکل ۶-ب). نتایج بدست آمده کاملاً منطبق بر نتایج حاصل از راندمان استخراج عصاره می‌باشد. معادله واقعی شبیه‌سازی تاثیر متغیرهای مستقل بر ماده خشک عصاره در رابطه ۱۰ نمایش داده شده است.

تاثیر متغیرهای استخراج بر میزان ماده خشک عصاره: جدول ۸ نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در پاسخ میزان ماده خشک را نشان می‌دهد. همان گونه که از نتایج مشخص است نسبت گیاه به حلال، غلظت اتانول در حلال و توان دوم میزان گیاه در حلال تاثیر معنی‌داری بر میزان ماده خشک عصاره‌ها داشته است. بر اساس شکل ۶-الف میزان اتانول حلال تاثیر منفی بر میزان ماده خشک عصاره



شکل ۶- اثر غلظت اتانول (الف)، نسبت گلبرگ به حلال (ب)، و اثر توان دوم نسبت گلبرگ به حلال (ث) بر ماده خشک نمونه‌های عصاره گلبرگ زعفران

Figure 6. Effect of ethanol concentration (a), petal to solvent ratio (b), and quadratic effect of petal to solvent ratio (c) on the dry matter of saffron petal extract samples

جدول ۸- آنالیز واریانس برای مطالعه معنی داری متغیرهای مدل بر پاسخ میزان ماده خشک

Table 8. Analysis of variance to study the significance of model variables on dry matter content response

منبع Source	جمع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	مقدار F F-value	مقدار P p-value	
مدل Model	13.98	5	2.80	5276.55	< 0.0001	معنی دار Significant
گلبرگ (P): حلال (S) A- A-P:S Ratio	13.95	1	13.95	26340.91	< 0.0001	معنی دار Significant
غلظت اتانول-B B-Ethanol concentration	0.0073	1	0.0073	13.87	0.0136	معنی دار Significant
AB	0.0030	1	0.0030	5.71	0.0624	
A ²	0.0112	1	0.0112	21.20	0.0058	معنی دار Significant
B ²	0.0000	1	0.0000	0.0560	0.8224	
باقی مانده Residual	0.0026	5	0.0005			
عدم برازش Lack of Fit	0.0008	3	0.0003	0.3143	0.8186	غیر معنی دار not significant
خطای خالص Pure Error	0.0018	2	0.0009			
Cor Total	13.98	10				

برای پاسخ ماده خشک با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم به صورت رابطه (۱۰) بدست آمد و ضریب همبستگی ۰/۹۹ بود.

رابطه (۱۰)

$$DM = -0.0029 + 0.696 \times P:S \text{ Ratio} - 0.0002 \times \text{Ethanol concentration} - 0.0007 \times P:S \text{ Ratio} \times \text{Ethanol concentration} - 0.0107 \times P:S \text{ Ratio}^2 + 0.000015 \times \text{Ethanol concentration}^2$$

بهینه‌سازی فرآیند استخراج: برای بهینه‌سازی، نتایج تیمارهای نسبت پودر گلبرگ به حلال و غلظت اتانول در محدوده اندازه‌گیری شده انتخاب شد و برای فراسنجه‌های میزان فنول کل، میزان آنتوسیانین کل، میزان مهار رادیکال‌های آزاد، راندمان استخراج و میزان فلاونوئید کل بیشترین مقدار ممکن انتخاب شد. نتایج بهینه‌سازی نرم افزار دیزاین اکسپرت نشان داد که بهترین نسبت ماده خشک به حلال و بهترین غلظت اتانول به ترتیب ۱/۰۰ درصد و ۱۸/۵۸ درصد بوده است. در این نقطه بهینه میزان فنول کل ۲۶۵/۵۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه و میزان آنتوسیانین کل ۳۳/۹۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه و میزان مهار رادیکال‌های آزاد ۶۲/۶۶ درصد و راندمان ۰/۴۹ و ماده خشک ۰/۶۷ و میزان فلاونوئید کل ۱۲۲/۰۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه بدست آمد. به منظور تایید نتایج بهینه حاصل از مدل، عصاره تحت شرایط بهینه پیشنهادی تولید شد و از نظر دو پارامتر فنول و فلاونوئید کل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج واقعی در شرایط بهینه مدل نشان‌دهنده میزان فنول کل ۲۶۰/۲۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه و میزان فلاونوئید کل ۱۰۹/۷۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه بود که حاکی از دقت مورد قبول مدل در فرآیند استخراج در این پژوهش می‌باشد. مقادیر بهینه فنول کل و فلاونوئید کل در مقاله‌ای تحت موضوع استخراج با روش خیساندن و پیش تیمار فراصوت از گیاه *Taraxacum assemanii*، به ترتیب ۱۳/۱۶

میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم ماده خشک و ۳/۲۱ میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم ماده خشک گزارش شدند (۴۹). همچنین، درصد بهینه مهار رادیکال آزاد در استخراج از گلبرگ زعفران در پژوهشی ۳۱/۱۵٪ اعلام شد (۵۰). گزارشی به بهینه‌سازی پارامترهای استخراج به کمک آب زیر دمای بحرانی از *Hibiscus sabdariffa* پرداخت (۵۱). مقادیر بهینه فنول کل ۳۹/۵۴ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم اعلام شد. مقدار آنتوسیانین بهینه در استخراج از گیاه *Clitorea ternatea* توسط اتانول ۳۷٪ در زمان ۹۰ دقیقه و دمای ۴۵ درجه سلسیوس، ۲۸/۶۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد. مقایسه مقادیر بهینه در پاسخ‌ها نشان داد که این فرآیند استخراج و سیستم بهینه‌سازی می‌تواند به عنوان یک مدل کاربردی در استخراج از گلبرگ زعفران، استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

استخراج ترکیبات زیست‌فعال و استفاده از آنها در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی بهداشتی امروزه افزایش چشمگیری داشته است. تکنولوژی‌های نوین استخراج و استفاده همزمان از این تکنولوژی‌ها، موضوع روز تحقیقات دنیا می‌باشد. در این تحقیق با توجه به پژوهش‌های پیشین از تکنولوژی‌های پلاسمای سرد به عنوان پیش‌تیمار، و از فراصوت جهت استخراج ترکیبات موثره گلبرگ زعفران استفاده شد و تیمارهای نسبت گیاه به حلال و درصد اتانول در حلال بهینه‌سازی شدند. نتایج بهینه نشان داد بهترین نسبت گیاه به حلال و بهترین غلظت اتانول به ترتیب ۱/۰۰ درصد و ۱۸/۵۸ درصد بوده است. در این نقطه بهینه، میزان فنول کل ۲۶۵/۵۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم و میزان آنتوسیانین کل ۳۳/۹۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم و میزان مهار رادیکال‌های آزاد ۶۲/۶۶ درصد و راندمان ۰/۴۹ درصد و ماده خشک ۰/۶۷ درصد و

تقدیر و تشکر

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی و بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری انجام شده است.

میزان فلاونوئید کل ۱۲۲/۰۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم تعیین شد. جهت تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود سایر پارمترهای موثر مانند دما، زمان و نوع حلال و شرایط فراصوت نیز بهینه‌سازی شود تا امکان تولید بیشتر ترکیبات زیست‌فعال میسر شود.

References

1. Gahruie HH, Parastouei K, Mokhtarian M, Rostami H, Niakousari M, Mohsenpour Z. Application of innovative processing methods for the extraction of bioactive compounds from saffron (*Crocus sativus*) petals. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2020;19:100264.
2. Stelluti S, Caser M, Demasi S, Scariot V. Sustainable processing of floral bio-residues of saffron (*Crocus sativus* L.) for valuable biorefinery products. *Plants*. 2021;10(3):523.
3. Khajeh-Hosseini M, Fallahpour F. Emerging innovation in saffron production. *Saffron: Elsevier*; 2020. p. 205-16.
4. Serrano- Díaz J, Sánchez AM, Maggi L, Martínez- Tomé M, García- Diz L, Murcia MA, et al. Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants. *Journal of Food Science*. 2012;77(11):C1162-C8.
5. Moshiri E, Basti AA, Noorbala A-A, Jamshidi A-H, Abbasi SH, Akhondzadeh S. *Crocus sativus* L.(petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2006;13(9-10):607-11.
6. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC pharmacology*. 2002;2:1-8.
7. Gahruie HH, Niakousari M, Parastouei K, Mokhtarian M, Eş I, Mousavi Khaneghah A. Co-encapsulation of vitamin D3 and saffron petals' bioactive compounds in nanoemulsions: Effects of emulsifier and homogenizer types. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2020; 44(8):e14629.
8. Marić M, Grassino AN, Zhu Z, Barba FJ, Brnčić M, Brnčić SR. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;76:28-37.
9. Chemat F, Rombaut N, Meullemiestre A, Turk M, Perino S, Fabiano-Tixier A-S, et al. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2017;41:357-77.
10. Hashemi SMB, Khaneghah AM, Koubaa M, Barba FJ, Abedi E, Niakousari M, et al. Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*. 2018;65:197-204.
11. Khajehei F, Niakousari M, Seidi Damyeh M, Merkt N, Claupein W, Graeff-Hoenninger S. Impact of ohmic-assisted decoction on bioactive components extracted from yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp.) leaves: Comparison with conventional decoction. *Molecules*. 2017;22(12):2043.
12. Manouchehri R, Saharkhiz MJ, Karami A, Niakousari M. Extraction of essential oils from damask rose using green and conventional techniques: Microwave and ohmic assisted hydrodistillation versus hydrodistillation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2018;8:76-81.
13. Cerdá-Bernad D, Baixinho JP, Fernández N, Frutos MJ. Evaluation of microwave-assisted extraction as a potential green technology for the isolation of bioactive compounds from saffron (*Crocus sativus* L.) floral by-products. *Foods*. 2022;11(15):2335.

14. Faria G, Souza M, Oliveira J, Costa C, Collares M, Prentice C. Effect of ultrasound-assisted cold plasma pretreatment to obtain sea asparagus extract and its application in Italian salami. *Food Research International*. 2020;137:109435.
15. Ahmadian S, Kenari RE, Amiri ZR, Sohbatazadeh F, Khodaparast MHH. Effect of ultrasound-assisted cold plasma pretreatment on cell wall polysaccharides distribution and extraction of phenolic compounds from hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *International journal of biological macromolecules*. 2023;233:123557.
16. Moradi- Sadr J, Ebadi MT, Ayyari M, Ghomi H. Optimization of ultrasonic bath and cold plasma pre- treatments in the spearmint essential oil isolation process. *Food Science & Nutrition*. 2023;11(4):1904-15.
17. Murakonda S, Dwivedi M. Combined use of pulse ultrasound–assisted extraction with atmospheric cold plasma: extraction and characterization of bioactive compounds from wood apple shell (*Limonia acidissima*). *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024;14(22):28233-51.
18. Balegh SM, Saadati P, Safiaghdam M, Fakhari AA, Razavi R. Effect of cold atmospheric plasma pre-treatment and ultrasound-assisted extraction on bioactive compounds and chemical quality of rice bran oil. *LWT*. 2025;117451.
19. Shahbazi H, Hashemi Gahrue H, Golmakani MT, Eskandari MH, Movahedi M. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science & Nutrition*. 2018;6(8):2568-77.
20. Aghajanoor N, Babakhani A, Tabarsa M. Optimization of the extraction of antioxidant compounds from brown algae *Sargassum angustifolium* in the Persian Gulf by response surface methodology (RSM). *Aquaculture Sciences*. 2020;8(1):43-58.
21. Venkatesan T, Choi Y-W, Kim Y-K. Impact of different extraction solvents on phenolic content and antioxidant potential of *Pinus densiflora* bark extract. *BioMed research international*. 20.۲۰۲۰.۶۷۵:(۱)۲۰.۱۹;۱۹
22. Tan QLP, Que AHN. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Polyscias fruticosa* (L.) Harms root. *Ученые записки Казанского университета Серия Естественные науки*. 2023;165(1):58-67.
23. Biswas A, Dey S, Xiao A, Deng Y, Birhanie ZM, Roy R, et al. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of antioxidant phenolics from *Corchorus olitorius* leaves: a response surface optimization. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2023;10(1):64.
24. Jaafar NF, Ramli ME, Salleh RM. Optimum extraction condition of *Clitoria ternatea* flower on antioxidant activities, total phenolic, total flavonoid and total anthocyanin contents. *Tropical life sciences research*. 2020;31(2):1.
25. Bamba BSB, Shi J, Tranchant CC, Xue SJ, Forney CF, Lim L-T. Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace and their antioxidant activity. *Molecules*. 2018;23(7):1685.
26. Li Y, Lai P, Chen J, Shen H, Tang B, Wu L, et al. Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina* Lindl. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2016;36(3):520-5.
27. Ghitecu R-E, Volf I, Carausu C, Bühlmann A-M, Gilca IA, Popa VI. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics sonochemistry*. 2015;22:535-41.
28. Elboughdiri N. Effect of time, solvent-solid ratio, ethanol concentration and temperature on extraction yield of phenolic compounds from olive leaves. *Eng Technol Appl Sci Res*. 2018;8(2):2805-8.
29. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12(2):457.
30. Bakoyiannis I, Daskalopoulou A, Pergialiotis V, Perrea D. Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;109:1488-97.

31. Rengarajan S, Melanathuru V, Govindasamy C, Chinnadurai V, Elsadek MF. Antioxidant activity of flavonoid compounds isolated from the petals of *Hibiscus rosa sinensis*. *Journal of King Saud University-Science*. 2020;32(3):2236-42.
32. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*. 2021;4:200-14.
33. Lin X, Wu L, Wang X, Yao L, Wang L. Ultrasonic-assisted extraction for flavonoid compounds content and antioxidant activities of India *Moringa oleifera* L. leaves: Simultaneous optimization, HPLC characterization and comparison with other methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2021;20:100284.
34. Liao J, Guo Z, Yu G. Process intensification and kinetic studies of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from peanut shells. *Ultrasonics sonochemistry*. 2021;76:105661.
35. Amyrgialaki E, Makris DP, Mauromoustakos A, Kefalas P. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2014;59:216-22.
36. Şahin S, Şamlı R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*. 2013;20(1):595-602.
37. Spigno G, De Faveri DM. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of food engineering*. 2009;93(2):210-7.
38. Ahmed T, Rana MR, Hossain MA, Ullah S, Suzauddula M. Optimization of ultrasound-assisted extraction using response surface methodology for total anthocyanin content, total phenolic content, and antioxidant activities of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024;14(22):28985-99.
39. Woon GZB, Oh KS, Tee LH, editors. Identification and optimization of anthocyanin extracted from *Dacryodes rostrata* peel. *AIP Conference Proceedings*; 2020: AIP Publishing.
40. Cui L, Zhang Z, Li H, Li N, Li X, Chen T. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from perilla leaves using response surface methodology. *Food Science and Technology Research*. 2017;23(4):535-43.
41. Yue Q, Tian J, Dong L, Zhou L. Comparison of an ultrasound-assisted aqueous two-phase system extraction of anthocyanins from pomegranate pomaces by utilizing the artificial neural network-genetic algorithm and response surface methodology models. *Foods*. 2024;13(2):199.
42. Che Sulaiman IS, Basri M, Fard Masoumi HR, Chee WJ, Ashari SE, Ismail M. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*. 2017;11:1-11.
43. Ozdemir M, Gungor V, Melikoglu M, Aydinler C. Solvent selection and effect of extraction conditions on ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from galangal (*Alpinia officinarum*). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2024;38:100525.
44. Chemat F, Rombaut N, Sicaire A-G, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier A-S, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*. 2017;34:540-60.
45. Zahari NAAR, Chong GH, Abdullah LC, Chua BL. Ultrasonic-assisted extraction (UAE) process on thymol concentration from *Plectranthus amboinicus* leaves: Kinetic modeling and optimization. *Processes*. 2020;8(3):322.
46. Rahaman A, Zeng X-A, Kumari A, Rafiq M, Siddeeg A, Manzoor MF, et al. Influence of ultrasound-assisted osmotic dehydration on texture, bioactive compounds and metabolites analysis of plum. *Ultrasonics sonochemistry*. 2019;58:104643.

47. Chen Y, Li M, Dharmasiri TSK, Song X, Liu F, Wang X. Novel ultrasonic-assisted vacuum drying technique for dehydrating garlic slices and predicting the quality properties by low field nuclear magnetic resonance. *Food chemistry*. 2020;306:125625.
48. Mindaryani A, Sulton A, Setiawan FA, Rahayuningsih E. Natural dye extraction from Merbau (*Intsia bijuga*) sawdust: Optimization of solid-solvent ratio and temperature. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*. 2023;51(6):481-92.
49. Yazıcı SÖ. Optimization of all extraction process for phenolic compounds with maximum antioxidant activity from extract of *Taraxacum assemanii* by statistical strategies. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15(5):4388-402.
50. Jabbari N, Goli M, Shahi S. Optimization of bioactive compound extraction from saffron petals using ultrasound-assisted acidified ethanol solvent: Adding value to food waste. *Foods*. 2024;13(4):542.
51. Rizkiyah DN, Putra NR, Idham Z, Che Yunus MA, Veza I, Harny I, et al. Optimization of red pigment anthocyanin recovery from *Hibiscus sabdariffa* by subcritical water extraction. *Processes*. 2022;10(12):2635.