# اثر کاربرد محلول‌های گوگرددار یا آنزیمی برای استخراج و شناسایی آنتوسیانین گلبرگ‌های زعفران و مقایسه آن‌ها با روش استحصال الکلی

**لیلا لطفی[۱]، احمد کلباسی اشتری[۲]*، منوچهر حامدی[۳]، فرشته قربانی[۴]**

۱، ۴، دانشجویان کارشناسی ارشد، گروه صنایع غذائی دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران

۲، دانشیار، گروه صنایع غذائی دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران

۳، استاد، گروه صنایع غذائی دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۱- تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۲/۳۱)

## چکیده

در تحقیق حاضر، پس از تهیه محلول‌های جداگانه گلبرگ زعفران با متابی‌سولفیت سدیم (از ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ppm)، آنـزیم (از ۱ تا ۱۰ درصد) و اتانول، مقدار و کیفیت آنتوسیانین هر یـک در ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۲۰، و ۱۸۰ دقیقـه سـنجش گردیـد. هنگامی‌که مقادیر متابی‌سولفیت سدیم و آنزیم به‌ترتیب به ۷۰۰ppm و ۱ درصد رسید، میزان آنتوسیانین استخراجی پس از ۱h به بیشینه خود و به‌ترتیب به۷۱۰ mg/100g و ۶۷۰ رسید. درحالی‌که بـشود میـزان تجزیـه‌پـذیری آنتوسـیانین در محلول‌های متابی‌سولفیت، آنزیمی، و الکلی پـس از۳h بـه‌ترتیـب بـه ۵/۰، ۵، و ۲۰ درصـد رسـید، میـزان سـیانیدین در آنتوسیانین روش‌های متابی‌سولفیت و یا آنزیمی بیشتر از روش اتانول بود و تغییرات آنتوسیانین‌های منومری و پلی‌مـری به‌ترتیب به ۱، ۸، و ۱۵ درصد رسید. به‌همین دلیل آنتوسـیانین حاصـل از روش‌هـای پایـداری و خلـوص رنـگ (کرومـا) بیشتری در مقایسه با همین رنگدانه در روش الکلی داشت.

**کلیدواژگان:** آنتوسیانین، آنزیم پکتینکس، پارامترهای رنگی، گلبرگ زعفران، متابی‌سولفیت سدیم.

## مقدمه

طبق آمارهای وزارت کشاورزی در سال ۱۳۸۸ مقدار زعفران تولیدی ایران معادل ۲۲۸ تن و ارزش صادرات آن بیش از ۷۰ میلیون دلارگردید. در بیشتر مناطق تولید این محصول پس از برداشت زعفران یا کلاله از سایر اجزای گل به‌ویژه گلبرگ آن استفاده نمی‌شود. جدول ۱ اجزای تشکیل‌دهنده نمونه‌ای از زعفران را در منطقه قائن نشان می‌دهد. به‌طورکلی از یک کیلوگرم گل تازه زعفران (با رطوبت متوسط ۸۰ درصد) ۸۵۰ گرم گلبرگ مرطوب (۸۵ درصد گل تازه)، و ۷۵ گرم (۵/۱درصد گل تازه) خامه و پرچم به‌دست می‌آید. ازطرفی از یک کیلوگرم گل تازه زعفران (با همان رطوبت) مقدار۲۰۰ گرم گل خشک و ۱۵ گرم (۵/۱ درصد گل تازه) کلاله خشک یا زعفران حاصل می‌شود. باتوجه به وزن زعفران تولیدی (حدود ۲۸۰ تن در سال) وزن کل گلبرگی که هر سال دور ریخته می‌شود به بیش از ۳۰۰۰ تن می‌رسد.

نظر به خواص آنتوسیانین‌ها در کاهش بیماری‌های کرونری قلب (Bakker *et al.*, 1998)، افزایش حد بینایی (Timberlake *et al.*, 1988) ، جلوگیری ازبروز بیماری‌های سرطانی به‌دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌ها (Wang *et al.*,2003)، و درمان افسردگی (Akhondzadeh-Basti *et al.*, 2007) ، و ازطرفی غنی‌بودن گلپوش‌های گل زعفران از فلاونوئیدها و رنگدانه آنتوسیانین‌ها (Hemati-Kakhki, 2010) توجه به این بخش گیاه افزایش یافته است. در برخی کشورها مانند آمریکا میانگین مصرف روزانه آنتوسیانین‌ها به‌صورت افزودنی در غذاهای روزانه به ۲۱۵ میلی‌گرم می‌رسد (Kähkönen *et al.*, 2001). در بافت گیاهی و در شیره سلولی با pH حدود خنثی، گلبرگ زعفران بنفش‌رنگ است و درصورت استخراج در محیط اسیدی به‌رنگ قرمز درمی‌آید (Fatehi *et al.*, 2003). پارامترهای مؤثر بر رنگ آنتوسیانین به ترکیب شیمیایی آن با گلیکوزیدها، گروه‌های آسیله شده موجود درساختار آن، واکنش آنتوسیانین با مولکول‌های دیگر، و شرایط محیطی بستگی دارد. در دی‌گلیکوزیدها هیدروکسیل آزاد موجود در آن گلیکولیزه و باعث افزایش پایداری آن می‌گردد و به‌همین دلیل دی‌گلیکوزیدها پایدارتر از منوگلیکوزیدها هستند (Francis *et al.*, 1989) آنتوسیانین‌ها با ساختارهای شیمیایی متفاوتی سازگار می‌شوند و به‌دلیل وجود عامل فلاویلیوم که قرمز یا بنفش است در محیط اسیدی پایداری بالایی دارند. به‌طورکلی رنگ پایدار آنتوسیانین به‌دلیل تشکیل کمپلکس‌های آن با

* نویسنده مسئول: akalbasi@ut.ac.ir

عناصر گوناگون است. برای نمونه می‌توان به ثابت‌ماندن رنگ آب توت‌فرنگی به‌علت تشکیل کمپلکس قلع با سیانیدین تری‌گیلکوزید اشاره کرد (Stintzing *et al.*, 2002). ازطرفی تیره‌رنگ‌شدن بسیاری از آب‌میوه‌ها و سبزی‌ها به‌علت درهم‌شدن وچندگانگی (Polymerization) آنتوسیانین‌های تک‌گانه (Monomeric) است. محققان دریافتند که افزایش کدورت و تیره‌شدن رنگ آب سیب و یا آب هلو نیز به‌دلیل انجام این فرایند است. ثابت دی‌الکتریک حلال استفاده‌شده، عامل فیزیکی دیگری است که با کم‌شدن آن، واکنش ذرات با بارهای منفی کاهش می‌یابد و سرعت خروج رنگدانه‌ها از بافت گیاهی زیاد می‌شود. هنگامی‌که به آب خالص با داشتن بیشترین دی‌الکتریک (معادل ۷۸/۵ و بیش از دو برابر اتانول یا معادل ۳۲/۶) متابی‌سولفیت افزوده می‌شود، انرژی لازم برای جداسازی مولکول‌ها از سلول‌های گیاهی کاهش می‌یابد و رنگدانه‌ها به آسانی اجازه ورود به داخل مولکول‌های حلال را پیدا می‌کنند. همچنین افزایش محدود دما، نرخ استخراج را افزایش می‌دهد و درنتیجه زمان رسیدن به تعادل کاهش می‌یابد و به‌همین سبب دمای ۳۰-۳۵°C در استخراج آنتوسیانین مناسب‌تر است ولی دمای بالاتر به تجزیه آن می‌انجامد (Bakker *et al.*, 1998). اثر دی‌اکسیدسولفور بر رنگ، ترکیبات فنولی، و کیفیت حسی شراب قرمز بررسی و نشان داده شد که $SO_2$ باعث پایداری رنگ و جلوگیری از درهم‌شدن مواد فنولی در طول دوره فرایند شراب‌سازی می‌شود. این پژوهشگران دریافتند که غلظت $SO_2$ درحدود ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (mg/kg) مقدار استخراج رنگ را بیشتر می‌کند و درنتیجه سرخی محصول بیشتر می‌گردد. به‌بیان‌دیگر شفافیت (L*) که معرف عبور نور ازمحصول است کمتر و دانسیته رنگ زیادتر می‌شود. ادغام آنتوسیانین‌ها با دیگر ترکیبات فنولی در طول دوره نگهداری فرایندی است که در تغییر رنگ از قرمز به قهوه‌ای نقش مهمی دارد. پژوهش‌های انجام شده نشانگر آن است که SO2 در جلوگیری از پدیده پلی مریزاسیون (درهم شدن) آنتوسیانین‌های تک‌گانه اثر بارزی دارد و به‌خوبی از قهوه‌ای‌شدن شراب جلوگیری می‌کند. آنزیم‌های پکتینولیتیک باعث تجزیه دیواره سلولی و همی‌سلولزی و لیگنینی گیاهان و آزادشدن مواد فیتوشیمیایی (پلی‌فنول‌ها و آنتوسیانین‌ها) از آب‌میوه‌ها در pH پائین می‌شود. با افزودن این نوع آنزیم‌ها مانند آنزیم پکتینکس بی‌ای (Pectinex BE) به آب انگور در ۶۰°C و در مدت ۳۰ دقیقه مقدار آنتوسیانین استخراجی از ۹۰۰ ( در نمونه بدون آنزیم ) به ۲۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (mg/kg) افزایش می‌یابد (Landbo & Meyer, 2004).

**جدول۱. درصد اجزای گل، میزان استحصال کلاله، طول، قطر نوک، وسط، و انتهای کلاله‌های جداشده از گل‌های زعفران**

| بخش‌ها و اندازه‌های متفاوت گیاه زعفران | میزان بازده ( درصد ) | اندازه میانگین (میلی‌متر) |
|---|---|---|
| مجموع گلبرگ، کاسبرگ، و دمگل به کل گیاه | ۸۰/۶۵ | - |
| پرچم به گل | ۹/۶۲ | - |
| خامه به گل | ۲۳/۲ | - |
| کلاله به گل | ۷/۴۵ | - |
| طول کلاله | - | ۲/۷۵±۰/۲۸ |
| قطر کلاله | - | ۱/۱۹±۰/۴۰ |
| قطر میانی کلاله | - | ۰/۷۷±۰/۱۸ |
| قطر انتهای کلاله | - | ۰/۶۱±۰/۱۷ |

هر چند راندمان استخراج با فناوری‌های جدید مانند اولتراسونیک، فشارهای فوق‌العاده زیاد هیدروستاتیک، پالس‌های الکتریکی، مایکروویو، سیاله‌های فوق بحرانی (Super critical)، و رزین‌های جذبی پلیمری برای استخراج مواد غذایی فراسودمند (Functional Food) مانند آنتوسیانین درخور توجه است، لیکن استفاده ازآن‌ها هنوز کاربردی و اقتصادی نشده است. به‌همین دلیل به استفاده از محلول‌های آبی (به‌جای حلال‌های الکلی) مانند آب سولفوره و محلول‌های آنزیمی که بتواند دیواره‌های سلولزی بافت‌های گیاهی (میوه، سبزی، و گل) را بشکند و آنتوسیانین را آزاد کند، در سال‌های اخیر توجه بیشتری شده است. باتوجه به مطالب ذکرشده و مقدار زیاد آنتوسیانین در گلبرگ و دورریزی فراوان گلبرگ زعفران در هر سال و از طرفی نقش خطرزدای این رنگدانه در جلوگیری از بروز سرطان در بدن، در این پروژه روش‌های استخراج آنتوسیانین از گلبرگ این گیاه وخالص‌سازی آن بااستفاده از محلول‌های گوگرددار و آنزیمی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

گل‌پوش‌های زعفران از تربت حیدریه خراسان تهیه و در حالت انجماد به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. پس از تهیه مواد شیمیایی شامل کلرید پتاسیم، اسیدکلریدریک، استات سدیم، اسیدسیتریک، سود، اتانول، متانول، بی‌سولفیت پتاسیم، متابی‌سولفیت سدیم، و اتیل‌استات از شرکت مرک آلمان روش‌های آزمایش زیر انجام گردید:

### آماده‌سازی مواد اولیه

پس از یخزدایی گلبرگ‌های زعفران در آزمایشگاه مواد خارجی آن جداسازی شد و در خشک‌کن تحت خلاء در ۴۰°C به‌مدت

۳۶ ساعت و تا رسیدن به رطوبت بین ۳ تا ۵ درصد خشک گردید. بااستفاده از روش AOAC درصد رطوبت محصول قبل و بعد از خشک‌کردن تعیین و بااستفاده از قهوه‌خردکن گلپوش‌های خشک‌شده به‌دقت خرد گردید به‌گونه‌ای که ذرات آن از غربال با مش شماره ۴۰ بگذرد. سپس پودر تهیه‌شده در شیشه‌ای قهوه‌ای‌رنگ بسته‌بندی و تا زمان تجزیه و استخراج در دمای ۱۸°C– نگهداری شد.

**تعیین مناسب‌ترین نسبت ماده جامد به حلال برای اســتخراج بهینه آنتوسیانین**

برای تعیین این نسبت سه مخلوط شامل یک گرم پودر گلبرگ خشک +۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر (یا نسبت ۱۰ درصد و بریکس ۷)، یک گرم پودر گلبرگ +۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر (یا نسبت ۶/۷ درصد و بریکس ۵/۲۵) و یک گرم پودر گلبرگ +۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر (یا نسبت ۴ درصد وبریکس ۳/۵) تهیه گردید. بااستفاده ازهمسان‌ساز (Homogenizer) پودر گلبرگ هر یک از نمونه‌ها کاملاً ریز و یکنواخت گردید تا انحلال مواد در آب بیشینه گردد و سپس با بهره‌گیری از جداکننده دورانی (Centrifuge) محلول زلال آن جداسازی شد. سپس رطوبت هریک از نمونه‌ها تبخیر و پودر باقیمانده هرکدام در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. بااستفاده از محلول بافر (pH=1.0) از هر نمونه غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، و ۵ درصد تهیه گردید. آنگاه مقدار جذب نوری هر نمونه بعد از مدت ۱۵ دقیقه آرامش (برای به‌تعادل رسیدن واکنش‌های شیمیایی) در اسپکتروفتومتر درطول موج ۵۲۰ نانومتر (بیشترین میزان جذب برای آنتوسیانین) خوانده شد.

**استخراج پیگمان با الکل اسیدی‌شده**

با مخلوط‌کردن اسیدکلریدریک ۱/۵ نرمال با اتانول ۹۵ درجه به‌ترتیب و با نسبت ۱۵ و ۸۵ درصد محلول الکلی تهیه و در محیط اسیدی (pH=1.0) و سپس به‌مدت ۱ دقیقه در بهم‌زن هموژنیزه گردید. آنگاه پودر گلبرگ با الکل اسیدی‌شده به‌ترتیب به نسبت ۱ به ۱۰مخلوط و در اطاقک تاریک ۴۰°C برای زمان‌های گوناگون ۱۰،۵، ۲۰، ۶۰، ۱۲۰، و ۱۸۰ دقیقه نگهداری شدند. پس از سواسازی مواد معلق هر نمونه (با به‌کارگیری گریزنده دورانی با گردش ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه) محلول زلال آن جمع‌آوری و به بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتر منتقل گردید. آن‌گاه بخش الکلی عصاره زلال استخراجی بااستفاده از دستگاه تبخیرکننده گردشی تحت خلاء در فشار منفی ۰/۱ مگاپاسکال (MPa) جدا گردید و برای انجام آزمون‌های بعدی در سردچال ۱°C–۵ نگهداری شد.

**استخراج آنتوسیانین با آب گوگرددار**

ابتدا بااستفاده از محلول‌های سود یک نرمال و اسیدسیتریک بافر (با pH=3.5) تهیه و ۲۰ میلی‌لیتر از آن با ۸۰ میلی‌لیتر از محلول اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال ممزوج گردید. در این روش ابتدا یک گرم از نمونه پودر گلبرگ زعفران با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول بافر یادشده مخلوط گردید و به‌طور جداگانه سطوح گوناگونی از غلظت ۰ ، ۱۰۰، ۴۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰، و ۲۰۰۰ppm متابی‌سولفیت سدیم به‌آن افزوده و مدت ۱۸۰ دقیقه در دمای ۴۰°C نگهداری شد. دلیل انتخاب ۳ ساعت زمان استخراج، حصول اطمینان از کافی‌بودن زمان انتخابی برای حداکثر استخراج و همچنین یکسان‌بودن اثر آن برای کلیه غلظت‌ها بود. سپس ازغلظت بهینه به‌عنوان پایه‌ای برای بررسی اثر زمان استخراج (سطوح آزمایشی ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۲۰، و ۱۸۰ دقیقه) استفاده گردید. برای بازیافت بهینه عصاره گلبرگ زعفران در فاز آبی، ابتدا ذرات شناور پودر گلبرگ در آب سولفوره هر نمونه به‌مدت یک دقیقه در دستگاه خردساز و یکنواخت‌کننده کاملاً ریز و با حلال ممزوج و سپس ذرات نامحلول دوباره با استفاده از گریزنده دورانی جداسازی گردید. محلول زلال یا روئین نمونه‌ها برداشت و با عبور از صافی با آب سولفوره شست‌وشو گردید. برای استخراج تمامی آنتوسیانین موجود در تفاله گلبرگ این فرایند دو بار انجام شد تا سرانجام ۲۵ میلی‌لیتر محلول بازیافتی از هر نمونه حاوی یک گرم پودر گلبرگ برای سنجش مقدار و ویژگی‌های آنتوسیانین به‌دست آید.

**استخراج آنزیمی آنتوسیانین**

در استخراج آنزیمی آنتوسیانین همانند روش استخراج با آب سولفوره ابتدا یک گرم از پودر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آبی بافر یا تامپون اسیدی(pH= 3.5) مخلوط و مدت یک دقیقه هموژنیزه گردید. سپس ازمحلول آنزیم‌های Pectinex Ultra SP-L(A) حاوی مخلوط آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز، همی‌سلولاز، و Cellubrix(B) دارای سلولاز و همی‌سلولاز هرکدام با درصد غلظت‌های حجمی گوناگون ۱، ۲/۵، ۵، ۵/۵، ۷، و ۱۰ درصد برای خارج‌سازی پیگمان آنتوسیانین ازمحلول تامپونی تهیه‌شده و دارای پودرگلبرگ زعفران در آب استفاده گردید. به‌منظور بررسی اثر زمان بر میزان استخراج زمان‌های مجاورت آنزیم با پودر گلبرگ ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، و ۲۴۰ دقیقه و دمای ۴۰°C بررسی شد. خالص‌سازی و تهیه هر نمونه محلول حاوی پیگمان‌های استخراجی با آنزیم‌ها همانند روش متابی‌سولفیت صورت گرفت.

**سنجش آنتوسیانین**

بااستفاده از محلول‌های کلرور پتاسیم، اسیدکلریدریک، و استات سدیم دوبافر (یکی با pH=1.0 و دیگری با pH=4.5) طبق روش (Fuleki & Francis, 1968b) تهیه گردید.

آن‌گاه یک میلی‌لیتر از هر نمونه از محلول‌های استخراجی حاوی آنتوسیانین به‌صورت دقیق یک‌بار با محلول بافر اول و یک میلی‌لیتر دیگر این بار با محلول بافر دوم در بالن‌های ژوژه به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانیده شدند. برای به‌تعادل‌رسیدن آنتوسیانین در محلول‌های جدید با بافرهای فوق هر دو محلول مدت ۱۵ دقیقه در جای آرامی نگهداری شدند. سپس میزان جذب نوری هر نمونه بااستفاده از کووت ۱۰ میلی‌لیتر و دستگاه اسپکتروفتومتر و میزان جذب‌های بیشینه و کمینه به‌ترتیب در طول موج‌های۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. ازآنجا که مواد کلوئیدی شناور باعث تفرق نور و ایجاد ظاهری ابری در هر نمونه می‌شدند ازاین‌رو سعی گردید تا حد ممکن نمونه‌های لازم شفاف و بدون هرگونه کدورت و یا رسوب باشند و برای تصحیح و محاسبهٔ تفرق نور از طول موج ۷۰۰ نانومتر استفاده گردید تا خطای حاصل از عوامل کدورت‌زا برطرف گردد. برای محاسبه مقدارکل آنتوسیانین براساس میزان جذب هر نمونه از فرمول‌های ۱ و ۲ Fuleki & Francis (1968b) و (1999) Abdel-Aal and Hucl استفاده گردید:

$$A = (A_{\lambda vis\,max} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{\lambda vis\,max} - A_{700nm})_{pH0.5}$$ (رابطه ۱)

(رابطه ۲)

$$\text{Monomeric anthocyanin pigment}\left(\frac{mg}{L}\right) = (A \times MW \times DF \times 1000)/(\varepsilon \times l)$$

که در آن A میزان جذب نوری محاسبه‌شده برای هر نمونه و طبق فرمول اول است، MW (molecular weight) مقدار وزن مولکولی آنتوسیانین، DF (dilution factor) فاکتور رقت، ۱ طول هر ضلع سطح مقطع کووت (۱ سانتی‌متر)، و ε جذب مولار برای نوع آنتوسیانین غالب است. لازم به آشکارسازی است که میزان MW و ε بستگی به نوع آنتوسیانین غالب در نمونه حلال دارد. اگر ترکیبات نمونه ناشناخته باشد، محاسبات رنگ براساس سیانیدین تری‌گلوکوزید با مشخصات (ε =26900 و MW =449.2) انجام می‌شود (Giusti & Wrolstad, 2001).

**تعیین ویژگی‌های رنگی آنتوسیانین استحصالی**

بعد از تعیین کمیت آنتوسیانین استخراجی وکاهش میزان گوگرد نمونه‌های استحصالی تا مرز ۲۵۰ پی‌پی‌ام بااستفاده از تبخیرکننده گردشی، ویژگی‌های رنگی آن بررسی شد تا بتوان اثر فرایند و شرایط استخراج را برکیفیت رنگدانه مطالعه کرد. بااستفاده از دستگاه رنگ‌سنج (Minolta) ویژگی‌های رنگی هر نمونه از محصول شامل شفافیت (Lightness)، شدت (Chroma)، و طول موج غالب نور یا زاویه هیو ($Hue^{o}$) تعیین گردید.

**تجزیه وشناسائی آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران**

تجزیه آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران با استفاده از روش (Jia *et al*., 2008) انجام گردید. ابتدا شفاف‌سازی عصاره‌های به‌دست‌آمده با روش گریزنده دورانی انجام و محلول زلال روئین هر نمونه از صافی PTFE با اندازه منافذ ۰/۴۵۱ میلی‌مترگذرانیده شد. سپس میزان ۵۰ میکرولیتر از هرعصاره به دستگاه HPLC با ستون زیر (RP C18 Nucleosil 100 (12.5 cm, 5.0 mm and 5.0 l/m تزریق شد تا بتواند ترکیبات آنتوسیانینی موجود در هر نمونه را جدا کند. فاز متحرک شامل مخلوط دو حلال A (۲/۵ درصد حجم به حجم محلول اسیداستیک در آب) و حلال B (۲/۵درصد حجم به حجم محلول اسیداستیک در متانول) درنسبت‌های متفاوت، نمودار حلال۱۰۰ درصد A در فاصله ۵-۰ دقیقه، ۹۰ درصد A در ۱۵ دقیقه، ۵۰ درصد A در ۴۵ دقیقه، و۱۰۰ درصد A در ۵۵ دقیقه و سرعت حجمی فاز آن برابر با۱۰ میلی‌لیتر در دقیقه است و کروماتوگرام‌ها در۵۱۰ نانومتر خوانده شد. برای سنجش آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران ابتدا نمونه‌های استاندارد سیانیدین ۳ و ۵ دی‌گلوکزید، پلارگونیدین ۳ و ۵ دی‌گلوکزید، دلفینیدین تری‌گلوکزید، پلارگونیدین تری‌گلوکزید، و پتونیدین به دستگاه تزریق گردید. با دست‌یابی به منحنی‌های استاندارد هر نوع آنتوسیانین (به‌عنوان مرجع) و مقایسه منحنی‌های آن مقدار هریک از آنتوسیانین‌های شش‌گانه موجود درگلبرگ زعفران شناسائی شد.

**سنجش آنتوسیانین‌های منومری و پلی‌مری**

در آغاز هر نمونه از عصاره آنتوسیانینی با محلول بافر اسیدی (pH=1.0) رقیق گردید و پس از دست‌یابی به میزان جذب نوری نمونه بیشینه ($\lambda_{vis\,max}$) فاکتور رقت آن یادداشت شد. سپس صفر دستگاه اسپکتروفتومتر که ۳۰ دقیقه قبل روشن شده بود با آب مقطر در طول موج‌های ۴۲۰، ۵۲۰، و ۷۰۰ نانومتر تنظیم شد. پس از کاربرد فاکتور رقت و رقیق‌سازی نمونه استخراجی آنتوسیانین یک میلی‌لیتر از آن را با آب مقطر در بالن ۲۵میلی‌لیتر به حجم رسانیده و مدت ۱۵ـ۶۰ دقیقه به آن آرامش داده شد. ۲/۸ میلی‌لیتر از این نمونه به یک کووت و همین حجم از نمونه به کووت دیگری منتقل گردید. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول بی‌سولفیت به یک کووت و۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر به کووت دیگر اضافه شد و هر دو نمونه پس از هم‌زدن اولیه همراه با تکرارهای آن مدت ۱۵ دقیقه آرام ماندند تا واکنش‌های درونی هر نمونه به تعادل برسند. مقدار جذب هر دو

نمونه در طول موج‌های ۴۲۰، ۵۲۰ (بیشترین جذب) و۷۰۰ نانومتر همزمان (بدون تأخیر) اندازه‌گیری گردید. برای تهیه محلول بی‌سولفیت روزانه مقدار یک گرم از متابی‌سولفیت پتاسیم در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌گردید. برای تعیین رنگ پلیمریزه‌شده و دانسیته رنگ و درصد رنگ پلی‌مریزه‌شده از روش Giusti Wrolstad (2001) and استفاده شد و چگالی رنگ و میزان آنتوسیانین‌های منومری و پلی‌مری براساس نتایج حاصل از مقدار جذب نوری نمونه‌های رنگبری‌شده (با بی‌سولفیت) و رنگبری‌نشده که به‌ترتیب آنتوسیانین‌های منومری و پلی‌مری گفته می‌شوند با فرمول‌های۳، ۴، ۵، ۶، و ۷ Kalbasi & Cisneros 2007) محاسبه گردید.

(رابطه ۳)

$$\text{Monomeric color}=[(A_{\text{max of unbleached sample}}-A_{700nm\text{ of unbleached sample}})-(A_{\text{max of bleached sample}}-A_{700nm\text{ of bleached sample}})]$$

(رابطه ۴)

$$\text{Monomeric color}=[(A_{\text{max of unbleached sample}}-A_{700nm\text{ of unbleached sample}})-(A_{\text{max of bleached sample}}-A_{700nm\text{ of bleached sample}})]$$

(رابطه ۵)

$$\text{Monomeric Acys (\%)}=(\text{Monomeric Color/Color Density}) \times 100$$

(رابطه ۶)

$$\text{Polymeric color of bleached sample}=(A_{max}-A_{700nm})+(A_{420nm}-A_{700nm})$$

(رابطه ۷)

$$\text{Polymeric Acys}=\text{Polymeric Color/ Color Density}) \times 100$$

که در این فرمول‌ها $A_{420nm}$، $A_{max}$، و $A_{700nm}$ به‌ترتیب مقادیر جذب نوری نمونه محصول درطول موج‌های ۴۲۰، ۵۲۰ (بیشترین جذب) و۷۰۰ نانومتر هستند.

**تعیین ضریب تجزیه‌پذیری (DI) Degradation Index**

برای تعیین مقدار DI، میزان جذب نوری هر نمونه از محلول حاوی آنتوسیانین در دو بافر ( pH=1.0) و (pH= 4.5) اندازه‌گیری شد. درحالی‌که مقادیرجذب خوانده‌شده در آن‌ها به‌ترتیب متناسب با مجموع آنتوسیانین‌های و آنتوسیانین‌های تجزیه‌نشده هر نمونه را نشان می‌داد. براساس گزارش Tsai and Huang (2004) از نسبت $A_{420nm}$ و $A_{520nm}$ به‌ترتیب مقادیر جذب نوری نمونه محصول درطول موج‌های ۴۲۰ و۵۲۰ نانومتر مقدار DI براساس فرمول (۸) به‌دست می‌آید.

$$DI=A_{420nm}/A_{520nm} \quad \text{(رابطه ۸)}$$

به‌دلیل مشابه بودن این فرمول با معادله پایه‌ای Fuleki & Francis (1968a)، مقدار این ویژگی از فرمول (۹) به‌دست آمد. در این فرمول T.O.D مقدار کل جذب نوری مجموع آنتوسیانین‌های هر نمونه و ΔD.O تفاوت جذب نوری بین آنتوسیانین‌های کل و آنتوسیانین‌های تجزیه‌نشده را نشان می‌دهد. به‌بیان دیگر این فرمول نسبت کل آنتوسیانین‌های هر نمونه را به آنتوسیانین‌های تجزیه‌شده تعیین می‌کند.

$$DI = T.O.D_{\text{ at pH 1.0}}/\Delta D.O. \quad \text{(رابطه ۹)}$$

**روش‌های تحلیل آماری نتایج**

تأثیرات عوامل متغیر در میزان آنتوسیانین استحصالی مانند غلظت متابی‌سولفیت و یا زمان مجاورت و واکنش بین حلال و پودرگلبرگ، بااستفاده از نرم‌افزار آماری مینی‌تب آنالیز واریانس ( به‌روش یک‌طرفه) و با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد مطالعه گردید. اعداد استفاده‌شده برای ترسیم نمودارها میانگین حداقل سه تکرار بودند.

برای ارزیابی سطح معنی‌داربودن برنامه آماری (T-Student) از اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

## نتایج و بحث

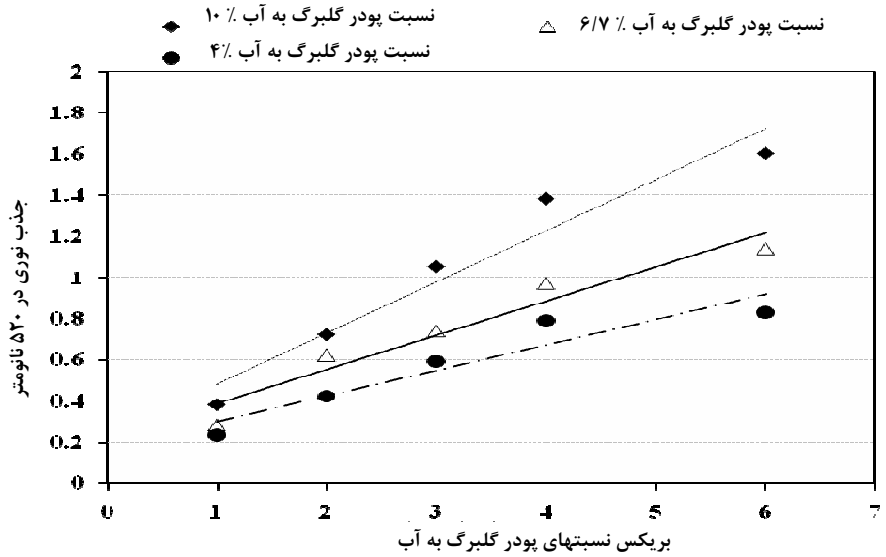
**تعیین مناسب‌ترین نسبت ماده جامد به حلال برای اســتخراج بهینه آنتوسیانین در محیط اسیدی**

اندازه‌گیری بریکس محلول ریز و یکنواخت‌شده پودر گلبرگ در محلول آب مقطر با (pH=1.0) نشان داد که با افزایش نسبت پودر گلبرگ به آب از ۴ تا ۱۰ درصد با وجود کاهش در نسبت ماده خشک محلول به ماده خشک کل، مقدار بریکس یا درصد ماده خشک محلول از ۳/۵ تا ۷ درصد افزایش یافت. نتایج سنجش میزان جذب نوری در شکل ۱ نشان داد که مقدار جذب نوری خوانده‌شده در اسپکتروفتومتر با میزان غلظت مواد محلول گلبرگ (عمدتاً پیگمان‌های رنگی) در آب مقطر اسیدی‌شده رابطه خطی دارد .همچنین هنگامی‌که نسبت مقداری پودر گلبرگ به حلال به ۱۰ درصد می‌رسد، میزان شیب یا شدت افزایش جذب نوری و راندمان استخراج ترکیبات رنگی گیاهی به بیشترین مقدار می‌رسد. بیشترین راندمان استخراج ترکیبات رنگی از بافت‌های گیاهی هنگامی به‌دست می‌آید که نسبت مواد جامد به حجم آب مقطر اسیدی نزدیک به ۱۰ درصد باشد (Giusti & Wrolstad, 2001).

**اثر غلظت متابی‌سولفیت و یــا آنــزیم بــر میــزان آنتوســیانین استحصالی**

شکل ۲ اثر غلظت‌های متفاوت سولفور به‌شکل متابی‌سولفیت در محلول گلبرگ زعفران را بر میزان آنتوسیانین استخراجی در دمای ثابت ۴۰°C و زمان واکنش ۱۸۰ دقیقه نشان داده است و بیانگر آن است که با زیادشدن غلظت متابی‌سولفیت تا میزان معینی در محلول مقدار آنتوسیانین استخراجی افزایش می‌یابد. شایان ذکر است که در همه شکل‌ها آنتوسیانین به‌صورت مخفف کلمه انگلیسی آن (Acys) نشان داده شده است. در ابتدا بخشی از آنتوسیانین موجود در گلبرگ در محلول آبی حتی بدون

متابی‌سولفیت به‌دلیل محیط اسیدی (pH=3.5) استخراج می‌شود. بسیاری از محققان مانند Pifferi & Vaccari (1983) آزادشدن بخشی از آنتوسیانین‌های نسوج گیاهی را در محیط آبی واسیدی تأیید کرده‌اند. با اضافه‌کردن متابی‌سولفیت به محلول آبی و اسیدی میزان آنتوسیانین استحصالی از کمینه ۵۰۰ واحد شروع می‌شود و به بیش از ۶۸۰ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پودر گلبرگ زعفران افزایش می‌یابد. افزایش غلظت متابی‌سولفیت و یا گوگرد در محیط آبی و اسیدی اثر معنی‌داری را در مقدار آنتوسیانین استخراجی از گلبرگ زعفران داشته است و آنالیز واریانس انجام‌شده برای چهار غلظت آزمایش شده متابی‌سولفیت این مطلب را تأیید کرد. در این مرحله حداکثر آنتوسیانین برابر ۶۴۰ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پودر گلبرگ (حدود ۳۰ درصد افزایش در مقایسه با نمونه شاهد) هنگامی به‌دست آمد که غلظت این ترکیب سولفوره در محیط آبی به ۷۰۰ppm رسید. گفتنی است که افزایش بیش از این مقدار متابی‌سولفیت نه‌تنها تأثیر معنی‌داری را در مقدار آنتوسیانین استحصالی ایجاد نکرد، بلکه به‌دلیل کم‌شدن قدرت دی‌الکتریک حلال، میزان آن کمی کاهش یافت.




**شکل ۱. اثر غلظت ماده خشک محلول مواد رنگی (برحسب درصد) بر میزان جذب نوری در نسبت‌های گوناگون پودر گلبرگ به آب در محیط اسیدی**

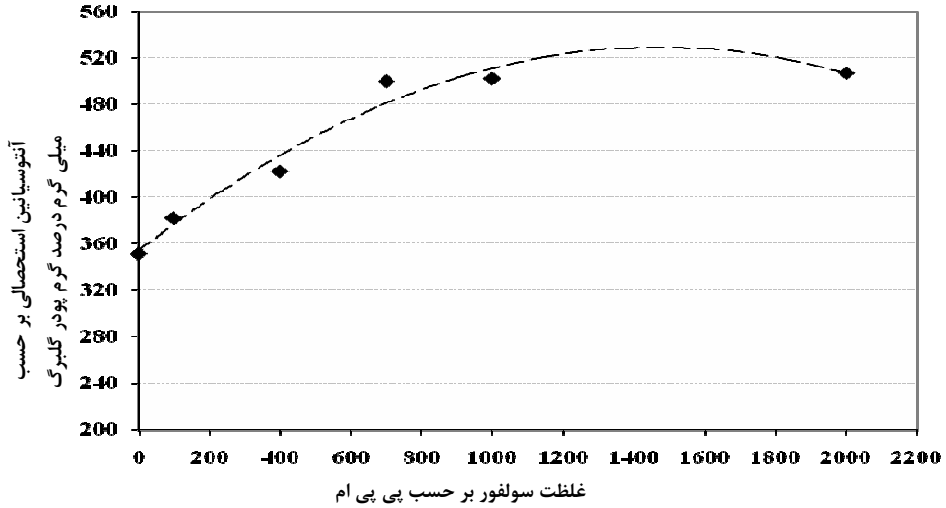
براساس گزارش Cacace & Mazza در (2002) ماکزیمم آنتوسیانین و دیگر مواد فنولیک از انگور سیاه هنگامی به‌دست می‌آید که غلظت $SO_2$ در محلول آبی به‌حدود ppm۱۲۰۰- ۱۰۰۰ و نسبت ماده جامد به حجم حلال یک کیلوگرم به ۱۹ لیتر برسد. آن‌ها گزارش کردند که در محدوده مشخصی رابطه خطی بین غلظت متابی‌سولفیت مصرفی و آنتوسیانین استحصالی از شاه‌توت وجود دارد و با افزودن ترکیبات گوگرددار از ppm۱۰۰۰ـ۳۰۰ سرعت نفوذ و مقدار آنتوسیانین به محیط آبی افزایش می‌یابد. بااین‌حال هنگامی‌که غلظت متابی‌سولفیت در محلول به بیش ازppm۱۰۰۰ می‌رسد ثابت دی‌الکتریک حلال کاهش می‌یابد و باعث درگیرشدن ملکول‌های مواد جامد با همدیگر می‌گردد و انرژی لازم برای جداسازی پیگمان کم می‌شود. ازآنجاکه آب گرم سرعت استخراج را افزایش می‌دهد، ازاین‌رو استفاده از آب گرم (بالاتر از $35^oC$) و اسیدی تأثیر بیشتری دارد و می‌تواند ترکیبات پیچیده مانند سلولز و آنتوسیانین‌های پلی‌مری را تجزیه کند (Jackman & others,1987; Cacace & Mazza, 2002; Ju & Howard, 2005). چون pH کم محلول استخراج‌کننده باعث دوام و پایداری آنتوسیانین می‌شود به‌همین دلیل محلول گوگرددار درpH=3.5 و دمای ۴۰ درجه سلسیوس تثبیت گردید. شایان ذکر است که استفاده از درجات حرارتی بالاتر از این مقدار باعث تجزیه و اکسیداسیون آنتوسیانین می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، روند استحصال پیگمان آنتوسیانین در محلول اسیدی گلبرگ زعفران از غلظتppm۷۰۰-۰ متابی‌سولفیت به‌صورت خطی افزایش یافت و پس از آن روندی نسبتاً کاهشی داشت. می‌توان نتیجه گرفت که غلظت بهینه که استخراج مناسب و کمترین میزان مصرف متابی‌سولفیت دارد معادل ppm۷۰۰ است. به‌همین دلیل در آزمایش‌های بررسی اثر زمان استخراج از همین غلظت استفاده شد. ازآنجا که حلال الکلی استفاده‌شده ترکیب ثابتی ازنظر اتانول و اسیدکلریدریک داشت، ازاین‌رو انجام آزمایش‌های اثر غلظت الکل منتفی گردید. نتایج بررسی دما نشان داد که با افزایش دمای استخراج از ۴۰ به $60^oC$ افزایش معنی‌داری در استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران به‌دست نمی‌آید، ولی از

زمان رسیدن به تعادل می‌کاهد. دما می‌تواند روی استخراج ترکیبات با بهبود و تغییر ضریب نفوذ و یا حلالیت آن در حلال اثر بگذارد. حتی در غلظت ۱۱۰۰ppm از $SO_2$ و نسبت بالای حلال به ماده جامد حدود۶۰ میلی‌لیتر در گرم، افزایش دمای استخراج از۴۰ به ۶۰°C منجر به کاهش مقدار آنتوسیانین گردید که این اثر به‌دلیل تجزیه آنتوسیانین در دمای بالا بود. کاهش آنتوسیانین در دمای بالاتر نشان از تجزیه آن در دمای بالاتر از ۴۰°C بود که این نتیجه با کار محققان دیگر همسوئی دارد. نظر بعضی از پژوهشگران بر این است که دمای بالاتر باعث افزایش نفوذپذیری غشاء سلول می‌شود ولی نتایج حاضر در این مقاله بیانگر این است که اثر تجزیه‌ای آنتوسیانین در دمای بالا بیشتر از اثر افزایش نفوذپذیری غشاء است. غلظت کمتر $SO_2$ باعث به‌تعویق‌افتادن تعادل غلظتی بین آنتوسیانین‌های باقی‌مانده در سلول‌ها و خارج‌شده از آن‌ها می‌گردد. زمان رسیدن به تعادل برحسب غلظت $SO_2$ و شرایط دیگر بین۲۰ تا ۱۳۶ دقیقه متغیر بود.

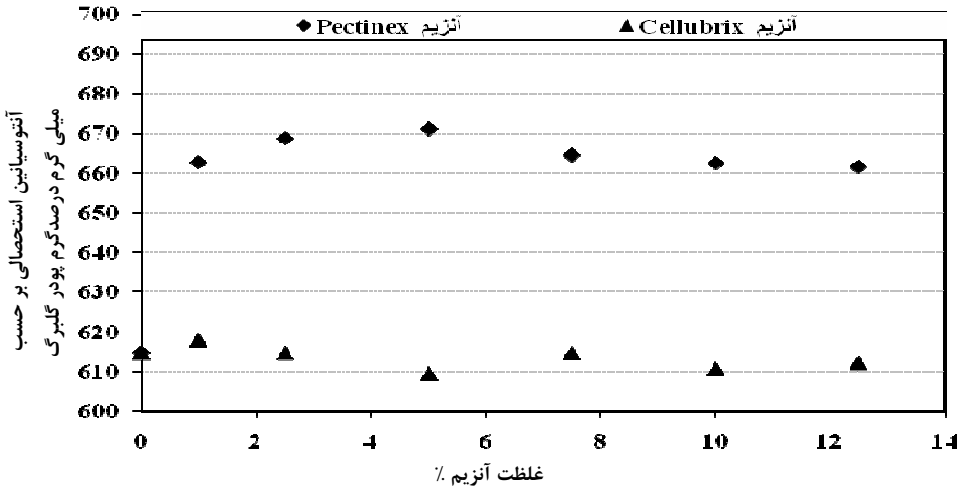
نتایج حاصل از اثر غلظت‌های گوناگون و جداگانه دو آنزیم پکتینکس و سلوبریکس در استخراج آنتوسیانین‌ها ی گلبرگ زعفران (شکل۳) نشان داد که توانایی آنزیم سلوبریکس به‌گونه‌ای است که مقدار آنتوسیانین استخراجی از گلبرگ زعفران در محیط اسیدی از بیشینه ۳۳۵ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم گلبرگ بیشتر نمی‌شود. آنزیم سلوبریکس خاصیت سلولیتیک دارد و باعث تجزیه باندهای سلولزی می‌شود. به‌نظر می‌رسد که فعالیت کمتر این آنزیم به‌دلیل کم‌بودن مقدار بافت‌های سلولزی در نمونه است. آنزیم پکتینکس Pectinex Ultra SP - L(A) به‌دلیل توانائی در دو بخش پکتیولیتیک و همی‌سلولیتیک دارای قدرت تجزیه بیشتری در مقایسه با آنزیم سلوبریکس است و میزان آنتوسیانین استخراجی را برای غلظت یک درصدی این آنزیم تا ۱۰۰ درصد افزایش داده و به میزان ۶۷۰ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم رسانده است. هرچند غلظت‌های بالاتر این آنزیم به میزان کمی آنتوسیانین استخراجی را افزایش داد ولی آنالیز واریانس یافته‌ها نشان داد که تفاوت به‌دست‌آمده معنی‌دار نیست. افزایش غلظت آنزیم باعث تخریب بافت سلولی می‌شود که علاوه‌بر افزایش در آنتوسیانین‌های استحصالی ممکن است ترکیبات دیگری مانند پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی دیگر نیز استخراج شوند، (Li *et al.*, 2006; Landbo & Meyer, 2001; Maier *et al.*, 2008) که پالایش بعدی آنرا مشکل می‌کند. به‌همین دلیل غلظت یک‌درصدی آنزیم پکتینکس برای دستیابی به بیشترین بازده در استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران انتخاب گردید.

### اثر زمان ماندگاری متابی‌سولفیت و یا آنزیم بر میزان استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران

به منظور بررسی اثر زمان ماندگاری متابی‌سولفیت بر میزان آنتوسیانین استخراجی، غلظت ۷۰۰ppm متابی‌سولفیت در پنج سطح زمانی ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۲۰، و ۱۸۰ دقیقه به‌کار گرفته شد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان مجاورت تا ۶۰ دقیقه میزان آنتوسیانین استخراجی افزایش سریعی پیدا کرد ودر این زمان به‌حدود ۵۰۰ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پودر گلبرگ رسید، ولی با افزایش زمان مجاورت تا ۱۲۰ و سپس ۱۸۰ دقیقه مقدار آنتوسیانین استخراجی افزایش چندانی نیافت (شکل ۴). آنالیز آماری نشان داد که بین میزان آنتوسیانین استخراجی زمان‌های ۰، ۶۰، ۱۲۰، و ۱۸۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و ازاین‌رو در متابی‌سولفیت با غلظت۷۰۰ ppm در محلول آبی و اسیدی پودر گلبرگ زعفران و زمان مجاورت ۶۰ دقیقه بالاترین میزان آنتوسیانین استخراج گردید.



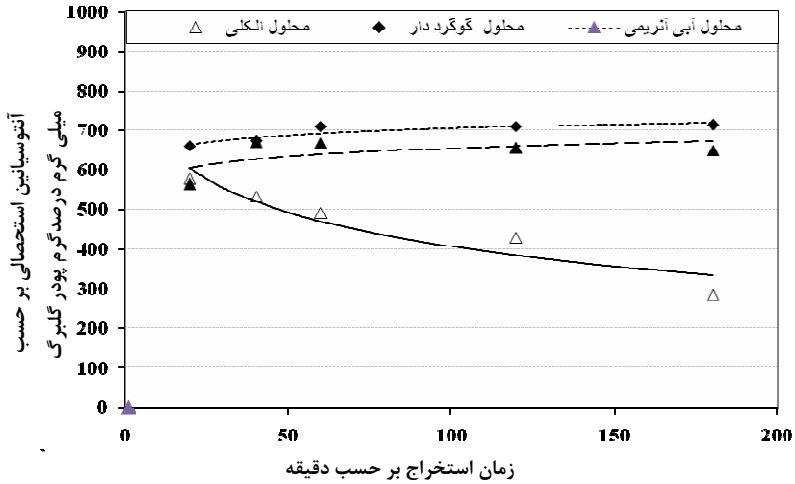

**شکل ۲. اثر غلظت متابی‌سولفیت بر میزان آنتوسیانین استحصالی از پودر گلبرگ زعفران**




**شکل ۳. اثر افزایش دو آنزیم پکتینکس و سلوبریکس در محلول آبی پودر گلبرگ زعفران بر میزان آنتوسیانین استخراجی**

در محلول الکل اسیدی‌شده با افزایش زمان مجاورت پودر گلبرگ از ۳ تا ۲۰ دقیقه، میزان آنتوسیانین استخراجی افزایش یافت ولی با مدت زمان بیشتر یعنی از ۲۰ تا ۱۸۰ دقیقه آنتوسیانین تولیدی تجزیه شد و مقدار آن کاهش یافت. درحالی‌که مقدار آنتوسیانین استخراجی در مدت بین ۳ تا ۲۰ دقیقه اختلاف شدیدی پیدا کرد و آنالیز واریانس نیز این تفاوت را تأیید کرد، ولی در زمان‌های بالاتر از ۲۰، ۶۰، ۱۲۰، و۱۸۰ دقیقه مقدار آنتوسیانین تولیدی با اختلاف معنی‌داری کاهش یافت که دلیل آن تجزیه آنتوسیانین به‌علت ماندگاری در محیط الکل اسیدی و در دمای ۴۰°C بود. بیشترین میزان آنتوسیانین استخراج‌شده ۵۷۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بود. شکل ۴ همچنین اثر زمان واکنش تا میزان سه ساعت را با فواصل زمانی۲۰ دقیقه برمیزان آنتوسیانین استخراجی تحت تأثیر آنزیم پکتینکس با غلظت بهینه یک درصد و در محیط آبی و اسیدی با دمای ۴۰°C از پودرگلبرگ زعفران را نشان می‌دهد. براساس این نتایج افزایش زمان واکنش از صفر تا ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰°C باعث ازدیاد آنتوسیانین استخراجی شد و این تفاوت در مقادیر آنتوسیانین استخراجی در زمان‌های بین ۰، ۲۰، ۴۰، و ۶۰ دقیقه بسیار معنی‌دار بود ولی با افزایش زمان ماندگاری، تأثیر زیادی در افزایش آنتوسیانین مشاهده نشد.

در زمان‌های بیش از ۲۰۰ دقیقه میزان آنتوسیانین استخراجی تحت تأثیر عوامل گوناگون کاهش شدیدی یافت. به‌طور کلی نتایج حاصل از این شکل نشان داد که روند افزایش آنتوسیانین تا زمان ۶۰ دقیقه، خطی و شیب بسیار تندی داشت، ولی پس از این زمان به دلایل متعدد از قبیل تولید فراوردهای جانبی آنزیم که گاه مانعی برای فعالیت آنزیم هستند، ملایم و کند گردید. ازاین‌رو باتوجه به نتایج حاصل اولین زمان بهینه استخراج آنزیمی آنتوسیانین از گلبرگ زعفران در ۶۰ دقیقه تعیین شد.




**شکل ۴. اثر زمان مجاورت پودر گلبرگ زعفران با محلول‌های اسیدی متابی‌سولفیت (به میزان ۷۰۰ppm)، آنزیم پکتینکس (به میزان یک درصد) و اتانول ۹۵ درجه بر میزان آنتوسیانین استخراجی**

جدول ۲. درصد آنتوسیانیدین‌های موجود درآنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران استحصالی از سه محیط الکلی، آب آنزیم‌دار، و آب گوگرددار

| آنتوسیانیدین‌های گلبرگ زعفران | الکل اسیدی | آب آنزیم‌دار | آب گوگرددار |
|---|---|---|---|
| سیانیدین ۳ و۵ دی‌گلوکزید (درصد) | ۲۳/۳ | ۳۲/۲ | ۳۸/۲ |
| پلارگونیدین۳ و۵ دی‌گلوکزید (درصد) | ۵۹/۲ | ۴۳/۲ | ۲۸/۷ |
| دلفینیدین تری‌گلوکزید (درصد) | ۵/۳ | ۳/۳ | ۱/۳ |
| پلارگونیدین تری‌گلوکزید (درصد) | ۰/۹ | ۰/۸ | ۱/۹ |
| پتونیدین و سایرآنتوسیانیدین‌ها (درصد) | ۱۱/۳ | ۲۰/۵ | ۲۹/۹ |

**اثر محیط حلال بر آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران**

نتایج آزمون‌های HPLC روی آنتوسیانین‌های استخراجی در محلول‌های آبی گوگرددار، آبی آنزیم‌دار ( دارای پکتینکس) و الکل اسیدی نشان داد که همه آن‌ها سیانیدین ۳ و ۵ دی‌گلوکزید، پلارگونیدین ۳ و ۵ دی‌گلوکزید، دلفینیدین تری‌گلوکزید، پلارگونیدین تری‌گلوکزید، و سایر آنتوسیانین‌ها به‌ویژه پتونیدین را دارند. برخی از محققان مانند Garrido & Diez De Bethencourt (1987) وجود پلارگونیدین و پتونیدین را در گلبرگ زعفران تأیید کردند. جدول ۲ ترکیبات آنتوسیانین‌ها را در سه محیط الکلی، آب آنزیم‌دار، و آب گوگرددار نشان می‌دهد. درحالی‌که سیانیدین۳ و۵ دی‌گلوکزید در محیط الکلی کمتر از محیط‌های آنزیمی و گوگرددار است، پلارگونیدین ۳ و ۵ دی‌گلوکزید روندی معکوس در این سه محیط دارد. به‌نظر می‌رسد که این تفاوت در این دو آنتوسیانین هم باعث تغییرات در آنتوسیانین استحصالی می‌گردد هم ثبات و پایداری آنتوسیانین را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

**اثر محیط حلال بر فاکتورهای رنگی پیگمان استحصالی**

کیفیت رنگی آنتوسیانین ارتباط تنگاتنگی با درجه اشباع(C) Chroma و شفافیت Lightness (L*) رنگ دارد. در ارتباط با خواص رنگی محلول‌های گوناگون آنتوسیانین ارتباط منفی بین مقدار این رنگدانه و L* مشاهده گردید. آزمایش‌ها نشان داد که مقدار و ویژگی‌های نهایی آنتوسیانین استخراجی به نوع، غلظت، و دمای حلال بستگی دارد و هنگامی‌که غلظت حلال به کمترین مقدار خود می‌رسد، مقدار آنتوسیانین ۸۰ درصد کمتر می‌شود.

Montes *et al.*, (2005) نشان دادند که پایین‌آمدن L و بالارفتن C زمانی اتفاق می‌افتد که حلال مشخص‌شده اتانول با اسیدکلریدریک اسیدی شده باشد. تجزیه مونومری و کمترشدن قرمزی رنگ آنتوسیانین‌ها باعث تغییر در a* و $h^{o}$ می‌شود (Yang *et al.*, 2008). این محققان دریافتند که افزایش مقدار b در حین حرارت‌دادن محلول آنتوسیانین نشان‌دهنده تغییر ساختاری و پیدایش ملکول‌های زردرنگ در آن است و سنجش ارزش‌های رنگی شامل شفافیت درجه اشباع و طول موج به‌عنوان شاخص کیفی پیگمان‌های رنگی در عصاره استخراجی شناخته می‌شود.

افزایش غلظت متابی‌سولفیت در حلال و یا زمان مجاورت حلال با پودر گلبرگ باعث تغییرات معنی‌دار در میزان شفافیت طول موج و درجه اشباع (ارزش‌های رنگی) گردید. جداول ۳، ۴، و۵ به‌ترتیب اثر غلظت‌های متفاوت آنتوسیانین (در اثر کاربرد مقادیر گوناگون غلظت متابی‌سولفیت) در محیط آبی، زمان مجاورت محلول‌های آنزیمی پکتینکس، و همچنین زمان مجاورت الکل اسیدی‌شده با پودر گلبرگ زعفران را بر میزان فاکتورهای رنگی و درجه تجزیه‌پذیری آنتوسیانین استخراجی نشان می‌دهد.

بیشترین رنگ قرمز آنتوسیانین(CVa) هنگامی به‌دست آمد که غلظت متابی‌سولفیت و زمان واکنش محلول با پودرگلبرگ به‌ترتیب برابر با ۷۰۰ppm و ۶۰ دقیقه گردید. Byamukama *et al.* (2006) آنتوسیانین واریته‌های هیپراستریوم را استخراج کردند و دریافتند که همبستگی خوبی بین آنتوسیانین‌های موجود در گلبرگ و شاخص‌های رنگی آن‌ها وجود دارد. با افزایش زمان مجاورت آنزیم با پودر گلبرگ از صفر تا ۶۰ دقیقه میزان آنتوسیانین تا مرز ۵۰۰ میلی‌گرم در یکصد گرم پودر گلبرگ رسید و قرمزی رنگ آنتوسیانین استخراجی نیز تا حداکثر خود افزایش یافت. ولی با تمدید زمان واکنش آنزیمی تفاوت معنی‌داری در مقادیر آنتوسیانین و فاکتورهای رنگ و به‌ویژه میزان قرمزی آن ایجاد نگردید. در غلظت‌های آنزیم بالاتر از یک درصد تقریباً تمامی پارامترهای رنگ ثابت ماندند. در محیط الکلی و اسیدی تا ۲۰ دقیقه کرومای رنگ آنتوسیانین استخراجی افزایش می‌یابد. ولی در زمان‌های ۲۰ دقیقه تا ۱۸۰ دقیقه، مقادیر C*، h، و L* به‌ترتیب کاهش، افزایش، و افزایش یافت. بیشترین کروما و کمترین شفافیت هنگامی به‌دست آمد

**جدول ۳. اثرافزایش غلظت متابی‌سولفیت بردرجه تجزیه‌پذیری وپارامترها یا ویژگی‌های رنگی آنتوسیانین گلبرگ‌های زعفران [۱]**

| غلظت متابی‌سولفیت پی‌پی‌ام | آنتوسیانین میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم | درجه تجزیه‌پذیری آنتوسیانین | شفافیت رنگ | میزان قرمزی رنگ۲ | میزان سبزی رنگ۳ | میزان خلوص رنگ۴ | طول موج غالب رنگ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۰ | ۴۸۰/۰$^{d}$ | ۱/۱۰ $^{a}$ | ۱۷/۰±۰/۱ $^{b}$ | ۴۷/۱±۰/۲ $^{d}$ | ۴۰/۴±۰/۱ $^{b}$ | ۱/۶۲±۰/۲ $^{d}$ | ۳۸/۳±۰/۳ $^{c}$ |
| ۱۰۰ | ۵۴۳/۹$^{c}$ | ۱/۰۹ $^{a}$ | ۱۶/۹±۰/۱ $^{b}$ | ۴۹/۴±۰/۱ $^{c}$ | ۴۰/۴±۰/۱ $^{b}$ | ۶۳/۸±۰/۲ $^{c}$ | ۳۸/۷±۰/۲ $^{c}$ |
| ۴۰۰ | ۶۰۰/۴$^{b}$ | ۱/۰۸ $^{a}$ | ۱۶/۳±۰/۷ $^{a}$ | ۵۱/۰±۰/۳ $^{b}$ | ۴۰/۱±۰/۱ $^{b}$ | ۶۴/۸±۰/۱ $^{b}$ | ۳۷/۷±۰/۲ $^{b}$ |
| ۷۰۰ | ۶۳۰/۷$^{a}$ | ۱/۰۷ $^{a}$ | ۱۶/۱±۰/۱ $^{a}$ | ۵۲/۵±۰/۳ $^{a}$ | ۳۹/۶±۰/۵$^{ab}$ | ۶۵/۸±۰/۲ $^{a}$ | ۳۷/۲±۰/۴ $^{ab}$ |
| ۱۰۰۰ | ۶۴۰/۱ $^{a}$ | ۱/۰۶ $^{a}$ | ۱۶/۱±۰/۱ $^{a}$ | ۵/۵۲±۰/۲ $^{a}$ | ۳۹/۳±۰/۲ $^{a}$ | ۶۵/۵±۰/۱ $^{a}$ | ۳۶/۸±۰/۱ $^{a}$ |
| ۲۰۰۰ | ۶۵۱/۳ $^{a}$ | ۱/۰۶ $^{a}$ | ۱۶/۱±۰/۲ $^{a}$ | ۵۲/۵±۰/۱ $^{a}$ | ۳۹/۳±۰/۳ $^{a}$ | ۶۵/۶±۰/۳ $^{a}$ | ۳۶/۸±۰/۱ $^{a}$ |

۱. اعداد هر ستون باپسوند الفبایی گوناگون تفاوت معنی‌دار دارند. ۲. ارزش قرمزی رنگ (a). ۳. ارزش سبزی رنگ (b) ۴. خلوص رنگ برابر با $(a+b)^{0.5}$

**جدول ۴. اثر افزایش زمان مجاورت گلبرگ‌های زعفران با محلول آنزیمی پکتینکس بر میزان، درجه تجزیه‌پذیری، و پارامترها یا ویژگی‌های رنگی آنتوسیانین استخراجی ۱**

| زمان برحسب دقیقه | آنتوسیانین برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم | درجه تجزیه‌پذیری آنتوسیانین | شفافیت رنگ | خلوص رنگ | طول موج غالب رنگ |
|---|---|---|---|---|---|
| ۰ | ۴۹۵/۲ $^{a}$ | ۱/۰۵ $^{a}$ | ۱۷/۰۱ $^{a}$ | ۶۴/۱۷ $^{a}$ | ۳۸/۱۷ $^{a}$ |
| ۲۰ | ۵۳۳/۷$^{b}$ | ۱/۰۶ $^{a}$ | ۱۶/۸۱ $^{a}$ | ۶۵/۴۰ | ۳۹/۴۶ $^{b}$ |
| ۴۰ | ۵۳۵/۹ $^{b}$ | ۱/۰۸ $^{a}$ | ۱۶/۷۵ $^{a}$ | ۶۵/۴۳ $^{b}$ | ۳۹/۴۷ $^{b}$ |
| ۶۰ | ۵۴۰/۴ $^{b}$ | ۱/۰۹ $^{a}$ | ۱۶/۷۴ $^{a}$ | ۶۵/۴۵ $^{b}$ | ۳۹/۴۶ $^{b}$ |
| ۱۲۰ | ۵۴۳/۹ $^{b}$ | ۱/۱۱ $^{a}$ | ۱۶/۷۳ $^{a}$ | ۶۵/۴۷ $^{b}$ | ۳۹/۴۶ $^{b}$ |
| ۱۸۰ | ۵۴۳/۵ $^{b}$ | ۱/۱۶ $^{b}$ | ۱۶/۷۴ $^{a}$ | ۶۵/۴۶ $^{b}$ | ۳۹/۴۷ $^{b}$ |

۱. اعداد هر ستون باپسوند ا لفبایی گوناگون، تفاوت معنی‌دار دارند.

**جدول ۵. اثر افزایش زمان مجاورت گلبرگ‌های زعفران با الکل اسیدی بر میزان درجه تجزیه‌پذیری، و پارامترها یا ویژگی‌های رنگی آنتوسیانین استخراجی ۱**

| زمان برحسب دقیقه | آنتوسیانین برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم | درجه تجزیه‌پذیری آنتوسیانین | شفافیت رنگ | خلوص رنگ | طول موج غالب رنگ |
|---|---|---|---|---|---|
| ۳ | ۳۸۶/۲ $^{a}$ | ۱/۱۴ $^{a}$ | ۱۲/۸۰ $^{a}$ | ۵۵/۷۹ $^{b}$ | ۳۷/۳۸ $^{a}$ |
| ۲۰ | ۴۳۷/۵ $^{b}$ | ۱/۱۶ $^{a}$ | ۱۲/۶۵ $^{a}$ | ۶۱/۱۰۰ $^{a}$ | ۳۷/۴۳ $^{a}$ |
| ۶۰ | ۳۷۲/۹ $^{b}$ | ۱/۲۰ $^{ab}$ | ۱۶/۱۶ $^{b}$ | ۵۳/۵۵ $^{b}$ | ۴۰/۳۲ $^{b}$ |
| ۱۲۰ | ۳۲۵/۱$^{c}$ | ۱/۲۶ $^{c}$ | ۱۹/۵۶ $^{c}$ | ۵۳/۳۲ $^{b}$ | ۴۴/۴۵ $^{c}$ |
| ۱۸۰ | ۲۱۴/۵$^{d}$ | ۱/۳۷ $^{d}$ | ۲۲/۵۵ $^{d}$ | ۵۲/۸۵ $^{b}$ | ۴۸/۲۲ $^{d}$ |

۱. اعداد هر ستون با پسوند الفبایی گوناگون، تفاوت معنی‌دار دارند.

که زمان مجاورت گلبرگ با الکل به ۲۰ دقیقه رسید. بااین‌حال برای دستیابی به شفافیت بیشتر و کرومای زیاد زمان ۶۰ دقیقه برای این حلال انتخاب گردید.

جدول ۳ نشان می‌دهد که میزان شفافیت آنتوسیانین با افزایش غلظت متابی‌سولفیت تقریباً ثابت مانده است و در غلظت‌های بیش از۴۰۰ppm تغییر چندانی نمی‌کند. با گذشت زمان دلیل ضریب تجزیه‌پذیری آنتوسیانین در محلول‌های گوگرددار ثابت و ازاین‌رو میزان شفافیت آن نیز ثابت می‌ماند. غلظت آنتوسیانین‌های استخراجی از گلبرگ زعفران با دو روش محلول متابی‌سولفیت و الکل اسیدی ذکرشده در جداول ۳، ۴، و ۵ گویای این واقعیت است که میزان شفافیت آنتوسیانین حاصل در روش‌های متابی‌سولفیت و آنزیمی به‌مراتب کمتر از شفافیت پیگمان استخراجی با الکل اسیدی است. هنگامی‌که غلظت آنتوسیانین حاصل در دو محلول متابی‌سولفیت و الکل اسیدی افزایش می‌یابد، به‌دلیل سرعت بیشتر واکنش قهوه‌ای‌شدن آنتوسیانین استخراجی با ترکیبات گوگردی در محلول متابی‌سولفیت بسیار شدیدتر از حلال الکلی است و این موضوع را بسیاری از محققان مانند Bakker *et al.* (1998) تأیید کرده‌اند. همان‌طور که در جداول ۳، ۴، و ۵ نشان داده شده است، میزان کرومای آنتوسیانین حاصل از محلول گوگرددار به‌دلیل سرعت کمتر تجزیه‌پذیری، به‌مراتب کمتر از آنتوسیانین استخراجی در محیط الکلی بود. با افزایش گوگرد به‌صورت

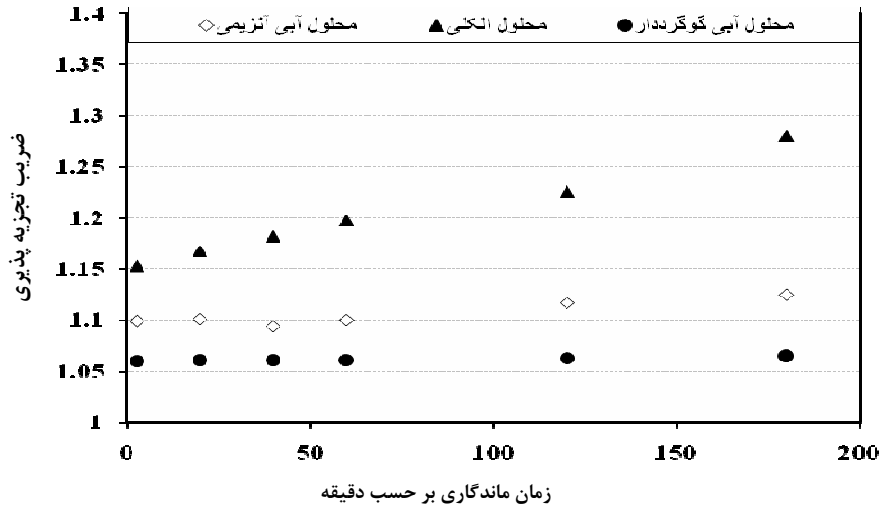
متابی‌سولفیت درمحلول آبی گلبرگ زعفران طول موج یا سرعت قهوه‌ای‌شدن کاهش (جدول۳) و درجه اشباع رنگ پیگمان استحصالی افزایش یافت. این نتایج با کارهای پژوهشی Bakker *et al.* (1998)مطابقت دارد. آن‌ها دریافتند که افزودن متابی‌سولفیت به آب انگور قرمز هم آنتوسیانین را زیاد می‌کند هم مقدار کروما را بیشتر و به‌دلیل افزایش تیرگی در رنگ، شفافیت آن را کم می‌کند. جدول ۴ اثر افزایش زمان مجاورت حلال آبی دارای آنزیم پکتینکس با پودر گلبرگ زعفران را بر میزان فاکتورهای رنگی و درجه تجزیه‌پذیری آنتوسیانین استخراجی نشان می‌دهد. زمان مجاورت آنزیم موجب کاهش درقهوه‌ای‌شدن و طول موج (هیو) مقدار آنتوسیانین استخراجی گردید و محتوای (درجه اشباع) رنگ افزایش و شفافیت و روشنی آن نیز کاهش معنی‌داری یافت. در غلظت‌های بالاتر از ۵ درصد پارامترهای ذکرشده تقریباً ثابت ماندند.

**درجه تجزیه‌پذیری (DI) آنتوسیانین در محلول‌های استخراجی**

میزان آنتوسیانین به‌دست‌آمده در حلال‌های حاوی متابی‌سولفیت آنزیم و الکل اسیدی و نگهداری‌شده در محیط آزمایشگاه ثابت نمی‌ماند و به‌تدریج تجزیه می‌گردد. بررسی‌های متعدد نشان داد که با گذشت زمان میزان درجه تجزیه‌پذیری (DI) آنتوسیانین در روش استخراج با حلال الکل بیشتر از روش استخراج با محلول آبی دارای متابی‌سولفیت بود و روش استخراج با آنزیم پکتینکس وضعیتی بین این دوحالت را داشت. براساس نظر Sweeney & Jacobucci (1983) مشخص شده است که علت پایداری آنتوسیانین‌ها افزایش اتصالات یونی آن‌ها با عوامل منفی ترکیبات گوگرددار و تشکیل فلاون، ایزوفلاون، و پلی‌هیدروکسی‌فلاون سولفوتانه، و سولفاته است. شکل ۵ نشان داد که در روش آب سولفوره با گذشت زمان در ۶۰، ۱۲۰، و ۱۸۰ دقیقه میزان DI به‌دلیل اثر سولفیت در نگهداری آنتوسیانین تقریباً ثابت ماند. همان‌طور که جدول ۵ نیز مؤید این نکته است که با افزایش غلظت بی‌سولفیت میزان تجزیه آنتوسیانین به‌دلیل ترکیب متابی‌سولفیت با آنتوسیانین و تشکیل کمپلکس پایدار آنتوسیانین ـ بی‌سولفیت کاهش می‌یابد.

**سنجش آنتوسیانین‌های پلی‌مری و منومری در گلبرگ زعفران**

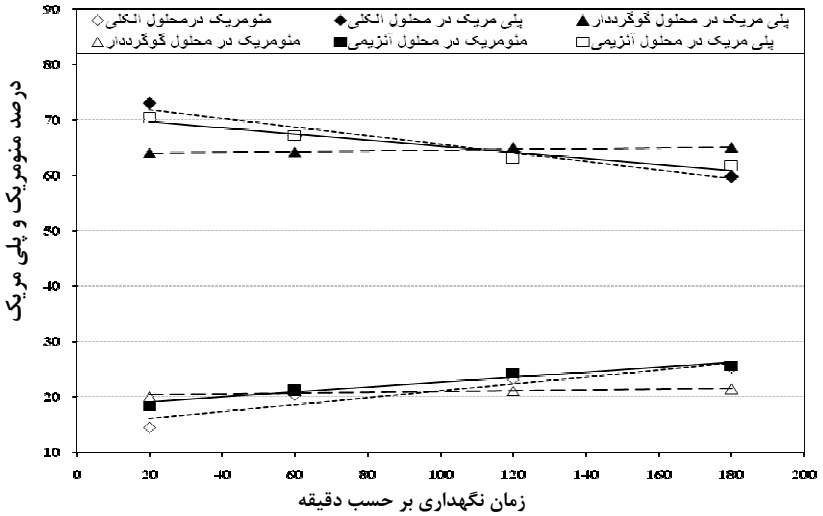
ازآنجاکه کربن آزاد شماره ۴ آنتوسیانین‌های منومری در محیط گوگرددار با متابی‌سولفیت ترکیب می‌شود (Wrolstad *et al.*, 2005)، بنابراین آنتوسیانین‌ها با ملکول‌های پیچیده‌ای مانند فنول‌ها، تانن‌ها، و پروتئین‌ها ترکیب نمی‌شوند. درحالی‌که، کربن آزاد شماره ۴ آنتوسیانین‌های منومری در محیط الکلی آزاد باقی می‌ماند و به‌سادگی پلیمریزه می‌شود. مکانیسم پایداری آنتوسیانین را می‌توان به‌دلیل تشکیل کمپلکس پیچیده و بسیار پایدار آنتوسیانین با $SO_2$ دانست. براساس نظر Gomez-Plaza *et al.*, (2002) در اثر تشکیل این کمپلکس واکنش‌های اکسیداسیون و نیز تولید فراورده‌هایی ناشی از واکنش‌های درهم‌شونده (Condense) به تعویق می‌افتد و یا از تشکیل آن جلوگیری می‌شود. Bakker *et al.*, (1998) نشان دادند که $SO_2$ از رنگ موجود در شراب قرمز در برابر پلیمریزاسیون محافظت می‌کند و این محلول بدون گوگرد رنگ پلیمریزه بیشتری در مقایسه با شراب گوگرددار دارد.




**شکل ۵. اثر افزایش زمان ماندگاری آنتوسیانین استخراجی با روش‌های گوناگون بر ضریب تجزیه‌پذیری آن**

افزودن متابی‌سولفیت به عامل فلاویلیوم باعث تبدیل آنتوسیانین به‌شکل بی‌رنگ آنتوسیانین ـ سولفونیک اسید می‌گردد ولی آنتوسیانین‌هایی که از قبل پلیمریزه شده‌اند به‌دلیل اینکه کربن شماره ۴ آن‌ها قبلاً با ترکیبات فنولیک

اشغال شده است، توانایی ترکیب با متابی‌سولفیت را ندارند. دمای مناسب باعث بهبود استخراج آنتوسیانین‌ها و افزایش ضریب نفوذ حلالیت آنالیت‌ها در حلال می‌گردد. ولی با افزایش دما، میزان رنگ و آنتوسیانین پلیمریزه‌شده افزایش می‌یابد. آزمایش‌های انجام‌شده نشان داد که دانسیته و درصد رنگ پلیمریزه آنتوسیانین استخراجی با متانول اسیدی‌شده بسیار بیشتر از همین ترکیب در آنتوسیانین حاصل از آب اسیدی‌شده است. بنابراین نتایج آنتوسیانین‌های حاصل از محیط متانول در مقایسه با آب آمادگی بیشتری برای تجزیه‌شدن و پلیمریزاسیون دارند. درحالی که با گذشت زمان تغییرات آنتوسیانین‌های منومری و پلی‌مری به‌مدت ۳ ساعت درمحیط محلول متابی‌سولفیت کمتر از یک درصد ( به‌ترتیب ۶۴ تا ۶۵ درصد و ۲۰تا ۲۱ درصد) و در محیط آنزیمی ۸ درصد مشاهده شد، گذشت همین زمان بر آنتوسیانین استخراجی در محیط آنزیمی باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار ۸ درصد ( به‌ترتیب ۶۲ تا ۷۰ درصد و ۱۸ تا ۲۶ درصد) و در محیط الکلی معنی‌دار و شدید ۱۲ درصد ( به‌ترتیب ۶۰ تا ۷۲ درصد و ۱۴ تا ۲۶ درصد) گردید (شکل ۶).




**شکل ۶. اثر زمان نگهداری پیگمان استخراجی در محیط‌های آبی (دارای متابی‌سولفیت)، آبی (دارای آنزیم)، و الکلی بر درصد آنتوسیانین‌های منومری و پلی‌مری در پودر گلبرگ زعفران**

## نتیجه‌گیری کلی

با افزودن $SO_2$ و یا آنزیم پکتینکس به گلبرگ زعفران واکنش‌هایی صورت می‌گیرد که به بهبود ضریب نفوذ حلال آبی به درون سلول‌های گیاهی و افزایش حلالیت ترکیبات فنولی و درپایان بهبود مکانیسم استخراج آنتوسیانین می انجامد و افزایش غلظت این دو ماده تا میزان معینی، آنتوسیانین بیشتری را از سلول‌های گیاهی استخراج می‌کند. نتایج حاصل از آزمون‌های این مطالعه نشان داد که در غلظت ۷۰۰ppm متابی‌سولفیت و ۱ درصد آنزیم مقدار آنتوسیانین حاصل به بیشینه خود و به‌ترتیب معادل ۷۱۰ و ۶۷۰ میلی‌گرم در یکصد گرم گلبرگ می‌رسد. درحالی‌که درصد تجزیه‌پذیری وهمچنین درصد تغییر در آنتوسیانین‌های منومری و پلی‌مری استخراجی با محلول متابی‌سولفیت به‌ترتیب به ۰/۵ و۱ درصد در مدت ۳ ساعت رسید. میزان این دو متغیر در استخراج آنتوسیانین در سایر شیوه‌ها به‌ترتیب به ۸ و ۵ درصد (روش آنزیمی) و ۱۵ و ۲۰ درصد (روش الکلی) رسید. ازطرفی در غلظت‌های مساوی، آنتوسیانین محلول متابی‌سولفیت کروما و شفافیت بیشتری در مقایسه با همین رنگدانه درروش‌های استخراج آنزیمی و الکلی داشت. بالاخره آنتوسیانین حاصل از روش متابی‌سولفیت دارای بیشترین و کمترین مقدار به‌ترتیب سیانیدین تری‌گلوکزید و پلارگونیدین ۳ و ۵ گلوکزید در مقایسه با دو روش دیگر بود. این نتایج نشان داد که آنتوسیانین گلبرگ زعفران استخراجی با روش متابی‌سولفیت پایداری بهتر، رنگ قرمز بیشتر، و ناخالصی بسیار کمتر در مقایسه با روش الکلی دارد و آنتوسیانین حاصل از روش آنزیمی ایمنی برتری (به‌دلیل استفاده‌نکردن از حلال آلی و گوگرد) در مقایسه با دو روش دیگر داشت.

## REFERENCES

Abdel-Aal, E. S. M. & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Journal of Cereal Chemistry,* 76, 350-354.

Akhondzadeh-Basti A., Moshiri E., Noorbala A., Jamshidi A-H, Abbasi S-H, & Akhondzadeh S. (2007). Comparison of petal of Crocus sativus L. and fluoxetine in the treatment of depressed

phenolic from dried red grape skin. *Journal of Food Science,* 70 (4), S270-S276.

Kähkönen, M. P., Anu I. Hopia, A. l. & Heinonen, M. (2001). Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.,* 49 (8), 4076–4082, 26 ref.

Kalbasi, A. & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Fractionation of monomeric and polymeric anthocyanins from Concord grape (Vitis Labrusca L.) juice by membrane ultrafiltration. *J. Agric. and Food Chem.,* 55, 7036-7042.

Landbo, K. & Meyer, S. E. (2004). Effects of different enzymatic maceration treatments of anthocyanin and other phenolics in black current juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies,* 5, 503-518.

Li, B. B., Smith, B., & Hossain, Md. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology,* 48, 189-196.

Maier, T., Goppert, A., Kammerer, R., Schieber, A., & Carle, R. (2008). Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (Vitis vinifera L.) pomace. *European Food Research Tecnology,* 227, 267-275.

Montes, C., Vicario, I.M., Raymundo, M., Fett R. & Heredia- Mira, F.J. (2005). Application of Tristimulus Colorimetry to Optimize the Extraction of Anthocyanins from Jaboticaba (Myricia Jaboticaba Berg.). *Food Research International,* 38 (8-9), 983-988.

Pifferi, P. G. & Vaccari, A. (1983). The anthocyanins of sunflower. II. A study of the extraction process. *Journal of Food Technology,* (18): 629-638.

Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B. & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50 (21), 6172–6181.

Sweeney, J. G. & Jacobucci, G. A. (1983). Effects of substitution on the stability of 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chemistry,* 31(3), 531-532.

Timberlake, C. F. (1988). Anthocyanins as natural food colorants. Progress Clinical and Bioloical Researches. *Progress in Clinical & Biological Research,* 280,107-21.

Tsai, P. & Huang, H. (2004). Effects of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International,* 37, 313–318.

Wang, H., Edward, J., Race, E. J. & Shrikhande, A. J. (2003). Anthocyanin transformation in cabernet sauvignon wine during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 51,7989-7994.

Wrolstad, R. E., Durst, R. W. & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Journal of Food Science and Technology,* 16, 423–428.

Yang, Z., Han, Y., Gu, Z. & Fan, G. (2008). Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (Zea mays L.) cob. *Innovative Food Science and Emerging Technologies,* 9, 341–347.

outpatients: A pilot double-blind randomized trial. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry,* 31, 439–442.

Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S. J., Garcı´a-Viguera, C., Reader, H. P. & Watkins, S. J. (1998). Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *J. Sci. Food Agric.,* 78, 297-307.

Byamukama, R., Monica Jordheim, M., Kiremire, B., Namukobe, J., & Andersen, Ø. M. (2006). Anthocyanins from flowers of Hippeastrum cultivars. *Scientia Horticulturae,* 109, 262–266.

Cacace, J. E. & Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J. Agric Food Chem.,* 50, 5939–46.

Fatehi, M., Rashidabady, T., & Fatehi-Hassanabad, Z. (2003). Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology,* 84, 199-203.

Francis, F. J. & Markakis, P. C. (1989). Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 28 (4), 273–314.

Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968a). Quantitative methods for anthocyanins II. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry. *Journal of Food Science,* 33, 78–83.

Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968b). Quantitative methods for anthocyanins I. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberry. *Journal of Food Science,* 33: 72–76.

Garrido, J. L. & Diez De Bethencourt, C. (1987). Estudio de los flavonoides contenidos en extractors hidrolizados de tepalos de Crocus Sativus L. *Journal of Analitical Bromatology,* XXXIX-1 (or 39-1), 69-80.

Giusti, M. M. & R. E. Worsltad. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry. Wiley Publishing Company, New York.*

Gomez-Plaza, E., Gil-Mun˜oz, R., Lo pez-Roca, J. M., Mart nez-Cutillas, A. & Ferna ndez-Ferna ndez, J. I. (2002). Maintenance of color composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.,* 35, 46–53.

Hemati-Kakhki, A. (2010). (1389 in Farsi). Stability of Anthocyanin Extracted from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petals in a Model Beverage. Proc. 3rd IS on Saffron. Eds.: M.Z. Tsimidou et al. 2010. *Acta Hort.* 850, ISHS: 247-250.

Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A. & Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as food colorants—a review. *J. Food Biochem.,* 11(3), 201–247.

Jia N., Shu Q-Y., Wanga L-S., Dua H., Yan-Jun Xu Y-J. & Liu, Z-A. (2008). Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars. *Sci. Hort.,* 117, 168-173.

Ju, Z.Y & Howard, R. L. (2005). Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other