استخراج و خالص‌سازی ترکیبات موثره زعفران

حمید رجبی[۱]، سید مهدی جعفری[۲*]

۱- دانشجوی دکتری مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استاد مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۴

پیام‌نگار: smjafari@gau.ac.ir

چکیده

زعفران به واسطه وجود ترکیبات موثره، یعنی کروسین، پیکروکروسین و سافرانال دارای خواص تغذیه‌ای بی‌شمار و ویژگی‌های حسی بی نظیری است. از این‌رو، استخراج و خالص‌سازی این ترکیبات برای کاربرد در صنایع غذایی و داروسازی از اهمیت بسزایی برخوردار است. روش‌های خیساندن، تقطیر بخار، فراصوت، سیال فوق بحرانی، استخراج فاز جامد و تبلور برای استخراج ترکیبات زعفران بررسی شده‌اند. وقت‌گیر بودن، پایین بودن بازده استخراج، مصرف حجم بالای حلال و غیراختصاصی بودن، از معایب روش‌های استخراج سنتی به‌شمار می‌آیند. برای خالص‌سازی ترکیبات زعفران، معمولاً از ترکیب دو روش استخراج استفاده می‌شود. استخراج عصاره زعفران به روش خیساندن و پس از آن تزریق عصاره به یک ستون حاوی فاز جامد راهی برای خالص‌سازی ترکیبات موثره آن به‌شمار می‌آید. در این مطالعه، به بررسی روش‌های مختلف استخراج و خالص‌سازی زعفران پرداخته شده است.

کلیدواژه‌ها: زعفران، کروسین، پیکروکروسین، سافرانال، استخراج، خالص‌سازی.

۱. مقدمه

زعفران یکی از دیرینه‌ترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی به‌شمار می‌آید که همواره مورد توجه آدمی بوده است. با توجه به شرایط اقلیمی کشور ما که آب یکی از عوامل عمدهٔ محدودکننده توسعه کشاورزی است، زعفران این گیاه کم توقع از بازده اقتصادی بالایی برخوردار است؛ زیرا زمان مصرف آب در زراعت زعفران موقعی از سال است که سایر محصولات به آب نیازی ندارند یا دست‌کم با مشکل کم‌آبی مواجه نیستند. این گیاه در دوران خواب زمستانی هم نیاز به آبیاری ندارد و رویش گیاه زعفران در فصل سرد پاییز و زمستان موجب می‌شود که این گیاه آفات و بیماری‌های ویرانگری نداشته باشد و سمپاشی‌های مکرر نیز برای آن ضروری نیست. ایران با سطح زیرکشتی در حدود ۶۲۰۰۰ هکتار و تولید سالیانه ۲۴۰ تن زعفران، با بیش از ۹۵٪ تولید جهانی، بزرگترین تولیدکننده زعفران از نظر کمیّت و کیفیّت در سطح جهان به‌شمار می‌آید[۱]. در دهه اخیر، تعداد کشورهای خریدار زعفران ایران افزایش یافته است. تولید زعفران ایران در سال ۱۳۹۴ حدود ۳۵۱۶۹۱ کیلوگرم با میانگین تولید ۳/۸ کیلوگرم بر هکتار بوده است (آمارنامه کشاورزی- وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۴).

با توجه به کاربردهای فراوان زعفران، اگر هر نفر ۰/۲۵ گرم زعفران در سال مصرف کند، جمعیت ۷/۴ میلیاردی جهان متقاضی ۱۸۵۰ تن زعفران خواهد بود و این تقاضا فقط برای مصرف شخصی

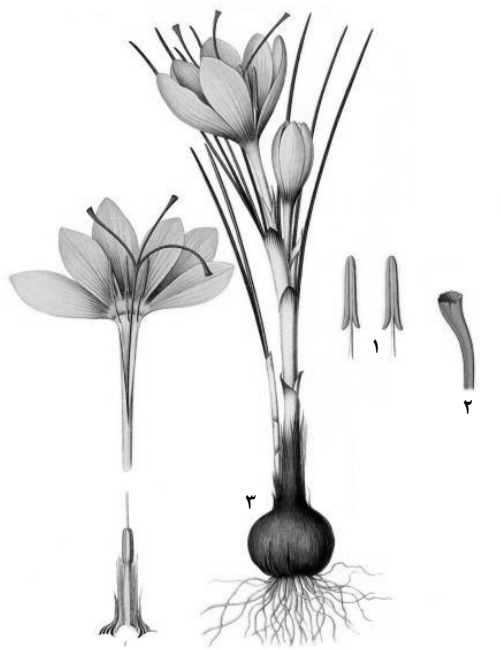
* گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده صنایع غذایی

است و مصارف دارویی و غذایی بر آمار یادشده افزوده خواهد شد. زعفران به مواد غذایی عطر و رنگ خاصی می‌دهد و به همین جهت از زعفران در صنایع غذایی مانند تولید سوسیس، شیرینی‌سازی، نساجی و صنایع لبنی مصرف می‌شود. یکی از محصولات تولیدی از زعفران افشانهٔ زعفران است که در حال حاضر دو واحد تولیدی کار خود را با تولید اسپری زعفران آغاز کرده‌اند و برای سایر نشان‌های تجاری مطرح در زمینه زعفران نیز بسته‌بندی این محصول را انجام می‌دهند. این محصول حاوی عصاره زعفرانِ کامل است که در ترکیب با سایر مواد افزودنی و تحت فشار یک مخزنِ استوانه‌ای را پر کرده است. از مزایای این افشانه می‌توان به استفاده راحت و قابلیت ماندگاری دردمای محیط، و از معایب آن می‌توان به طعم نه چندان واقعی و نیز ناپایداری رنگ آن اشاره کرد.

در زمینه فرآوری زعفران، تاکنون فعالیت‌های نسبتاً پردامنه‌ای در زمینه غذایی و دارویی انجام شده است. عمده تحقیقات در زمینه دارویی بر استخراج ترکیبات زیست فعال (مخصوصا کروسین) و بررسی تأثیر آن بر بیماری‌های مختلف، از جمله چاقی، آلزایمر و دیابت متمرکز بوده است[۴-۲]. در زمینه غذایی، تحقیقاتی در حوزهٔ تولید محصولات مختلف از زعفران انجام شده است. رجبی[1] و همکاران (۲۰۱۵) ریزپوشانی عصاره تام زعفران را با بهره‌گیری از مواد دیواره‌ای مختلف به‌کمک خشک کن پاششی ارزیابی و بررسی کرده‌اند. هاشمی و همکاران (۱۳۹۳) تولید شربت رژیمی زعفران با بهره‌گیری از استویا را بررسی کردند. باتوجه به این‌که بیش از ۹۵٪ زعفران دنیا در ایران تولید اما فروش و صادرات آن عمدتاً به صورت خام انجام می‌شود، بنابر نتایج بررسی‌های انجام شده، هنوز فعالیت تحقیقاتی و در پی آن صنعتی جامع و دقیقی روی خالص‌سازی ترکیبات زعفران انجام نشده است و می‌توان با برنامه‌ریزی و بهره‌گیری از پتانسیل علمی یک گروه توانمند این کار را انجام داده و از مزایای بی‌شمار این ترکیبات در صنایع مختلف، از جمله صنایع داروسازی و غذایی بهره‌مند شد.

۲. مشخصات گیاه‌شناسی زعفران

زعفران[2] با نام علمی *Crocus sativus* L.، گیاهی چند ساله، به خانواده زنبقیان[3] و راسته لیلیال‌ها[4] تعلق دارد. این گیاه علفی، بدون ساقه و پیازدار است. گل‌های زعفران از ۳ گلبرگ و ۳ کاسبرگ تغییر شکل یافته به رنگ بنفش، ۳ پرچم و مادگی با یک تخمدان واقع در مرکز گل، تشکیل شده است. از قسمت تخمدان خامه باریک و بلندی به رنگ زرد روشن به طول ۷ تا ۱۰ سانتی‌متر خارج می‌شود و در انتها به سه کلاله بوقی شکل به رنگ قرمز عنابی، هر رشته به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر، ختم می‌شود. این سه کلاله پس از خشک شدن، زعفران تجاری را تشکیل می‌دهند که معطر و دارای بوی تند و طعمی تلخ است[۷]. در شکل (۱) اندام‌های گیاه زعفران و زیر اندام‌های گیاه زعفران را مشاهده می‌کنید.



شکل ۱. اندام‌های گیاه زعفران؛ ۱. پرچم؛ ۲. کلاله؛ ۳. پیاز.

۲-۱ ترکیب شیمیایی کلاله زعفران

ترکیب شیمیایی زعفران ایرانی در جدول (۱) درج شده است. زعفران حاوی مواد معدنی، آب، موسیلاژ، چربی، موم و یک اسانس معطر و مواد مؤثری متشکل از سه هتروزید است[۷]. ترکیبات موثره زعفران شامل پیکروکروسین (پیش‌ساز سافرانال)، کروسین (متعلق به کاروتنوئیدها و استر گلیکوزیدی کروستین) و سافرانال (ترکیب فرار) است[۸].

1. Rajabi
2. Saffron
3. Iridacea
4. Liliales

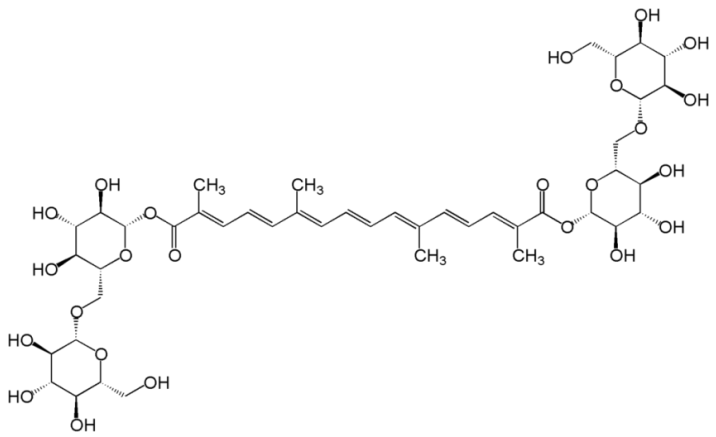
جدول ۱. ترکیب شیمیایی زعفران[۹].

ردیف	ترکیب	مقدار (٪)
۱	۴،۲- دی هیدروکسی-۵،۲- دی متیل-۳- فوران-۳- وان	۰/۵۳
۲	بتا ایزوفورن	۱/۸۳
۳	۳،۲- دی هیدرو-۵- هیدروکسی-۶- متیل- پیران-۴- وان	۰/۳۹
۴	۲- ایزوپزوپیلیدین-۳- متیل-هگزا-۵،۳- دی انال	۰/۹
۵	بنزن اتانول	۰/۵۱
۶	ایزومنتون	۰/۷۵
۷	آلفا ایزوفورن	۱/۲۷
۸	کتوایزوفورن	۰/۵۱
۹	۲-هیدروکسی ایزوفورن	۰/۳۷
۱۰	۴- پیران-۴- وان-۳،۲- دی هیدرو۳،۵- دی هیدروکسی-۶- متیل	۱/۹۳
۱۱	ترانس ۳(۱۰)- کارن-۲- ال	۰/۵۱
۱۲	دی هیدرو اکسو فورن	۱/۱۶
۱۳	سافرانال	۲۶/۲۹
۱۴	یوکاروون	۳/۱۵
۱۵	۵،۵،۳- تری متیل-۲- هیدروکسی-۴،۱- سیکلوهگزادی ان-۲- ان	۰/۳۶
۱۶	۲- فوران کربوکسی آلدئید-۵- هیدروکسی متیل	۱/۵۳
۱۷	مینت فورانون ۱	۰/۳۵
۱۸	بی سیکلو (۳،۲،۰) هپت-۲- ان-۴- اتوکسی- اندو	۵/۶۹
۱۹	۵،۵،۳- تری متیل-۴- هیدروکسی-۱- سیکلوهگزادی ان-۲- ان	۰/۹۸
۲۰	۷- متیل-۳- متیلن هگزاهیدروبنزوفوران-۲- وان	۰/۷۵
۲۱	۱- سیکلوهگزانون، ۲- متیل-۲- (۳- متیل-۲- اگزابوتیل)	۳/۱
۲۲	بدون نام	۰/۹
۲۳	بتا لونول	۰/۳
۲۴	۴،۴،۲- تری متیل-۳- کربوکسی آلدئید-۵- هیدروکسی-۵،۲- سیکلوهگزا دی ان-۱- وان	۲/۰۵
۲۵	ایزوفورن اکسید	۱/۲
۲۶	HTCC	۴/۴۴
۲۷	n- دودکانول	۱/۳
۲۸	ترانس-۱۰- متیل دکالون-۱	۰/۹۳
۲۹	آلفا لونون	۰/۴۸
۳۰	ناشناخته	۰/۶۶
۳۱	اکتادکان	۳/۲۹
۳۲	n- هگزادکانوئیک اسید	۲/۰۴
۳۳	لینولئیک اسید	۴/۷۷
۳۴	دوکوزان	۲/۸
۳۵	نونادکانول	۳/۳۲
۳۶	دوکوزانول	۲/۸۱
۳۷	تری کوزان	۲/۹
۳۸	تری کوزانول	۱/۶۹
۳۹	ناشناخته	۰/۶۲۳
۴۰	پنتاکوزان	۰/۷۴۵

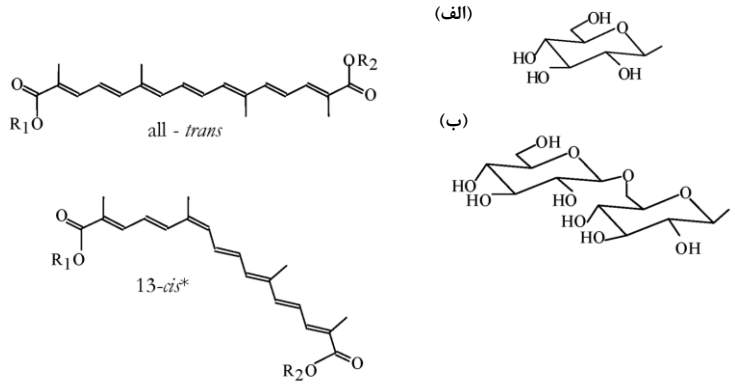
۲-۱-۱ رنگ زعفران

عامل اصلی قدرت رنگی کلاله‌های زعفران ترکیبی به نام کروسین و مشتق آن کروستین با فرمول شیمیایی شکل‌های (۲) و (۳) است. کروسین یکی از چند کاروتنوئید محدود موجود در طبیعت است که به آسانی در آب حل می‌شود. این حلالیّت یکی از دلایل کاربرد وسیع آن به عنوان رنگ دهنده در مواد غذایی و دارویی، نسبت به سایر کاروتنوئیدهاست. علاوه بر کروسین، زعفران حاوی آگلیکون کروستین به صورت آزاد و مقادیر کمی رنگدانه آنتوسیانین است.

قدرت رنگی زعفران یکی از پارامترهای عمده تعیین‌کننده کیفیّت زعفران به‌شمار می‌آید که با اندازه‌گیری میزان ترکیبات رنگی موجود در آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر به‌کمک طیف‌نگار ارزیابی و بررسی می‌شود[۵]. دو منبع برای استخراج کروسین در دسترس است. منبع اصلی تأمین این ترکیب زعفران و گیاهی با نام گاردنیا نیز دارای مقدار کمی کروسین است. معمولا در مواردی که هدف جداسازی کروسین و پیکروکروسین است، فرایند جداسازی همراه باهم انجام می‌شود.



شکل ۲. ساختار کروسین[۵].



R1=R2=H کروستین (فقط آل- ترانس)[1]

R1=H، R2=b ترانس-۲-G؛ استر ترانس- کروستین (بتادی- جنتیوبیوزیل)[2]

R1=a، R2=b ترانس/ سیس -۳-Gg؛ استر ترانس/ سیس- کروستین (بتادی- گلوکز)- (بتادی- جنتیوبیوزیل)[3]

R1=R2=b ترانس/ سیس-۴-GG. استر ترانس/ سیس- کروستین دی-(بتادی- جنتیوبیوزیل)[4]

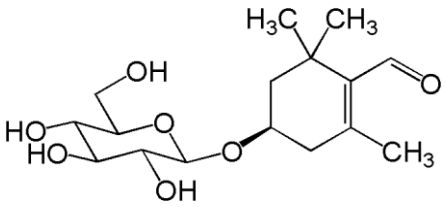
شکل ۳. استرهای کروستین[۱۱].

1. Crocetin (only all-trans)
2. Trans-2-G, trans-crocetin (ß-D-gentiobiosyl) ester
3. Trans/cis-3-Gg, trans/cis-crocetin (ß-D-glucosyl)-(ß-D-gentiobiosyl) ester
4. Trans/cis-4-GG, trans/cis-crocetin di-(ß-D-gentiobiosyl) ester

۲-۱-۲ طعم زعفران

عمده‌ترین ترکیب ایجاد کننده طعم تلخ در زعفران، گلیکوزیدی بی‌رنگ به نام پیکروکروسین با فرمول شیمیایی $C_{16}H_{26}O_7$ (شکل (۴)) است. این ماده تلخ و قابل تبلور است و از طریق هیدرولیز اسید، گلوکز و آلدئیدی به‌نام سافرانال تولید می‌کند[۷].

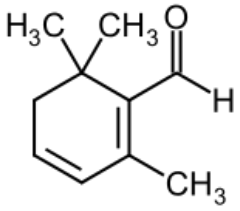
پیکروکروسین در واقع یک گلیکوزید بی رنگ است که نیمهٔ قندی آن متشکل از D- گلوکز و نیمه آگلیکون آن ۶،۶،۲- تری متیل-۴- هیدروکسی-۱- کربوکسی آلدئید-۱- سیکلوهگزان (HTCC) است که از تجزیه قسمت آگلیکون طی فرایند خشک کردن، سافرانال تولید می‌شود[۱۲].



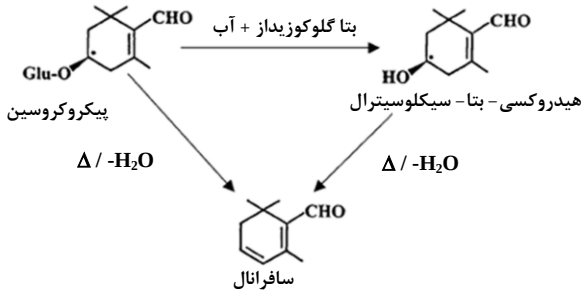
شکل ۴. ساختار پیکروکروسین[۵].

۲-۱-۳ ترکیبات معطر زعفران

عطر زعفران مربوط به روغن‌های فرار موجود در آن به‌شمار می‌آید که بسیار روان و مایعی بی‌رنگ از رده‌ترپن‌ها ($C_{10}H_{16}$) است. اسانس‌های استخراجی به سادگی اکسیژن جذب می‌کنند و به مایع غلیظ و قهوه‌ای رنگی به نام سافرانال $C_{10}H_{14}O_2$ (شکل (۵)) تبدیل می‌شوند. اسانس‌های روغنی زعفران فوق‌العاده ناپایدارند و در بازار قابل عرضه نیستند، ولی به جای آنها محلول الکلی زعفران به منظور عطر و طعم‌دهندگی به غذا و مصرف در عطرسازی به کار می‌رود[۷]. زعفران تازه برداشت شده فاقد و یا دارای مقدار بسیار کمی از این ترکیب فرار است. طی فرایند خشک کردن کلاله و نیز طی نگهداری زعفران، پیکروکروسین به سافرانال تجزیه می‌شود (شکل (۶)). طی این فرایند، یک واکنش دو مرحله‌ای آنزیمی/ آب‌زدایی رخ می‌دهد و پیکروکروسین یا مستقیماً از طریق آبزدایی در دمای بالا تحت یک pH گسترده (۶ تا ۱۰) به سافرانال تبدیل و یا این‌که ابتدا به یک ترکیب واسطه (R-۴ هیدروکسی-β- سیکلوسیترال) تبدیل و سپس این ترکیب به سافرانال تبدیل می‌شود[۱۰].



شکل ۵. سافرانال.



شکل ۶. واکنش تولید سافرانال[۱۱].

۲-۲ خواص دارویی زعفران

زعفران به عنوان یک گیاه دارویی و ادویه‌ای از دیرباز مصرف می‌شده است. در یونان قدیم، از زعفران به عنوان دارو و در علم طب به منظور معالجه بسیاری از بیماری‌ها مانند چشم‌درد و امراض زنانه به‌کار گرفته می‌شده است[۱۳]. از زعفران به عنوان مسکن سرفه و برونشیت‌های مزمن و تسکین درد دندان و رفع حالتهای تشنجی و بی‌خوابی و دفع سنگ کلیه و صفرا و قاعده‌آور و تقویت‌کننده بینایی و درمان اسهال در متون یادشده است. در طب عامیانه، نقاط مختلف جهان، زعفران در حکم آرام‌بخش، ضد کشیدگی عضلانی، اشتهاآور و مقوی معده به کار می‌رود. در سرزمین آلمان، زعفران به عنوان آرام‌بخش، درمان درد معده و شکم و کاهش آثار آسم مصرف می‌شود. زعفران پیشگیری‌کننده بیماری‌های قلبی و سرطان، تقویت‌کننده حافظه و کاهش‌دهنده فشار خون است. تحقیقات پزشکی نیز ثابت کرده‌اند که مواد آنتی‌اکسیدان موجود در زعفران از خواص ضد سرطانی برخوردارند[۱۴]. زعفران چربی و کلسترول خون را پایین می‌آورد. زعفران دارای خواص ضد التهابی نیز هست؛ این امر به سلامت قلبی- عروقی انسان کمک می‌کند[۱۵]. بر اساس تحقیقات انجام شده، زعفران خاصیت کاهش چربی و کلسترول خون و افزایش نفوذ اکسیژن در پلاسما را بروز داده است. افزایش‌دهنده میل جنسی، ضدسرماخوردگی، ملین، کمک‌کننده

بـه هضـم غـذا، ضـد تشـنج و آرامـش بخشـی از دیگـر خـواص زعفران‌اند[۱۶].

۲-۳ نگهداری زعفران

کلاله تازه زعفران را پس از خشک و سرد کردن، داخل ظروف عایق به نور و اکسیژن قـرار مـی‌دهنـد. زعفـران ممکـن اسـت در ظـروف شیشه‌ای، پاکـت‌هـای پلـی اتیلنـی، قـوطی‌هـای پلـی اتیلنـی و یـا پاکت‌هـای آلومینیـومی لایـه دار بسـته بنـدی شـود. دمـای محـل نگهداری آن نباید از ۲۰°C بیشتر باشـد[۱۷]. بـا توجـه بـه اینکـه اسانس زعفران قابل تبخیر شدن است، در صورت نگهداری نامناسب به مرور زمان این اسانس تبخیر و از آثـار دارویـی و طعـم و مـزهٔ آن کاسته می‌شود و مرغوبیت‌اش از دست می‌رود[۱۸]. فرآوری زعفـران به کلیه عملیات پس از برداشت اطلاق می‌شود که مسـتقیماً توسـط تولیدکننده و یا عوامل تخصصی دیگر انجام می‌شود و هـدف از آنهـا ارائه محصول بازارپسند با کیفیت مناسب به مصرف‌کننـدگان اسـت. مراحل فرآوری شـامل جابجـایی و ترابـری گـل، جداسـازی کلالـه، خشک کردن، نمونه‌برداری و آزمون، دسته‌بندی، بسته‌بندی و فروش است. در مواردی، به جای فروش زعفران بـه صـورت کامـل ممکـن است ترکیبات موثره آن استخراج و به فروش برسد. می‌تـوان قـرص زعفران را از طریق آسیاب و مخلوط کردن آن با ترکیبـات پرکننـده تولید کرد[۱۹].

۳. اندازه‌گیری ترکیبات زیست‌فعال زعفران

ترکیبات زیست‌فعال زعفران برطبق استاندارد ایزو ۲-۳۶۳۲ (۲۰۱۱) و بر اساس اندازه‌گیـری جـذب نـوری آنهـا در طـول مـوج بیشـینه اندازه‌گیری می‌شود. برای این آزمایش، ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه توزین و به بالن ژوژه ۱۰۰۰ میلی‌لیتری منتقل و ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر و مگنت به بالن افزوده می‌شود. بالن به مدت یک سـاعت روی همـزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و دور از نور قرار می‌گیرد. پس از گذشت این مدت زمان، محلول به حجم رسـانده و ۲۰ میلـی لیتر از محتویات آن به بالن ژوژه ۲۰۰ میلی لیتری منتقل و به حجم رسانده می‌شود. محلول رقیق شـده بـا بهـره‌گیـری از کاغـذ صـافی استات سلولز یا پلی تترا فلوئورواتیلن آبدوست با اندازه منافـذ ۰/۴۵ میکرومتر صاف شده و جـذب آن در طـول مـوج‌هـای ۲۵۷، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر (به ترتیب برای پیکروکروسـین، سـافرانال و کروسـین) قرائت می‌شود. برای بیان مقدار ترکیبات فرار زعفران در نمونه آنالیز شده از این رابطه بهره می‌گیرند:

$$A_{1cm}^{1\%}(\lambda_{max}) = {D \times 10000}/{m \times (100 - w_{MV})} \quad (۱)$$

که در آن D جذب ویژه، m وزن نمونه به گرم، و w_{MV} میزان رطوبت و مواد فرار نمونه مورد آزمایش‌اند[۲۰].

۴. استخراج ترکیبات زعفران

روش‌های مختلفی برای استخراج عصاره زعفران به کـار بـرده شـده است. متداول‌ترین روش استخراج عصاره زعفـران، خیسـاندن اسـت. بهتـرین حـلال در ایـن روش مخلـوط ۵۰:۵۰ آب: متـانول اسـت. محققان مختلف تأثیر عوامل دخیل در بازده اسـتخراج شـامل دمـا، زمان، نـوع حـلال، انـدازه ذرات، نـوع صـافی و جـز آنهـا را ارزیـابی کرده‌اند. آماده‌سازی عصاره تأثیری بسیار چشمگیر در صحت و دقت اطلاعات دارد. گزارش شده است نوع حلال، زمان و روش اسـتخراج نه تنها سرعت نفوذ ترکیبات را از عرض دیواره سـلولی تحـت تـأثیر قرار می‌دهد، بلکه می‌تواند پایداری آنها را نیز تغییر دهد[۲۱].

۴-۱ روش‌های سنتی

متـانول و اتـانول آبـی و آب را معمـولاً بـرای اسـتخراج ترکیبـات زیست فعال به کـار مـی‌برنـد. اسـتخراج و خـالص‌سـازی کروسـین به فراوانی در منابع آمـده اسـت[۲۴-۲۲]. پـس از حـذف چربـی بـا دی اتیل اتر، کلاله ۲ تا ۳ بار با استفاده از اتانول یا متانول ۹۰-۷۰٪ استخراج می‌شود. زمان اسـتخراج، مرحلـه صـافش (صـافی‌گـذرانی) عصاره، نوع صافی و حـلال بـر قـدرت رنگـی عصـاره زعفـران تـأثیر می‌گذارد. بالاترین بازده استخراج عصاره زعفران مربـوط بـه متـانول ۵۰٪ و پس از آن اتانول ۵۰٪، اتـانول ۲۵٪ و آب اسـت. بـا افـزایش زمان استخراج تا ۲۴ ساعت، قدرت رنگی کاهش مـی‌یابـد. مشـخص شده است که بهترین اندازه منافذ صافی برای دستیابی بـه بـالاترین قدرت رنگی، ۵ تا ۱۰ میکرومتر است. مرحله استخراج کردن عصـاره بر قدرت رنگی عصاره تأثیر می‌گذارد. در صورتی که صـافش پـس از رقیق‌سازی انجام شود، قدرت رنگی کـاهش مـی‌یابـد در حـالی کـه

صافش قبل از رقیق‌سازی، سبب افزایش قدرت رنگی می‌شود[۲۱]. ضرغامی و هینز[1] (۱۹۷۱) ترکیبات لیپیدی زعفران شامل ایزوفورن، ۶،۶،۲- تری متیل-۴- هیدروکسی-۱- سیکلوهگزن-۱- کربوکسی آلدئید و ۴،۴،۲- تری متیل-۳-فورمیل-۶- هیدروکسی-۲،۵- سیکلوهگزیدین-۱- وان را با بهره‌گیری از دی اتیل اتر در یک حمام یخ خشک استخراج کردند. پس از سانتریفیوژ کردن و صافش، عصاره تغلیظ شده و ترکیبات فرار با استفاده از کروماتوگرافی گازی جداسازی و بازیابی شدند[۲۵]. ایبورا[2] و همکاران (۱۹۹۲) از حلال‌های مختلف شامل اتیل اتر، استون، استونیتریل، متانول، اتانول، ایزوپروپانول، اتانول آبی (۵۰٪) و آب برای استخراج عصاره زعفران استفاده کردند. بنابر نتایج به دست آمده، در بین حلال‌های مورد استفاده، آب از بالاترین کارایی برخوردار بود و به ترتیب ۸۸، ۹۸ و ۷۰ درصد از پیکروکروسین، HTCC و کروسین را استخراج کرد[۱۲]. سرفرازی[3] و همکاران (۲۰۱۵) بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زعفران با بهره‌گیری از روش سطح پاسخ را بررسی کردند؛ متغیرهای مورد بررسی شامل غلظت‌های مختلف اتانول، دما و زمان بود. بنابر نتایج به دست آمده، میزان $A_{1cm}^{1\%}(\lambda_{max})$ ترکیبات زعفران یعنی کروسین، پیکروکروسین و سافرانال، به ترتیب، ۲۳۱۱/۶۸، ۱۱۹۰/۴۸ و ۴۷۴/۰۲ درصد بود. بهترین شرایط استخراج به صورت غلظت اتانول ۳۳/۳۳٪، زمان استخراج ۲ ساعت و دمای ۸۵°C بود[۲۶].

در مطالعه دیگری، از پترولیوم اتر سبک، دی اتیل اتر و اتانول آبی ۷۰٪ در سوکسله برای استخراج عصاره زعفران بهره بردند و حلال حذف شد. جداسازی اولیه کروسین در یک ستون حاوی مواد بسته‌بندی با اندازه ذرات ۵۷ تا ۷۶ میکرومتر ، فشار ۲×۱۰^{۵} پاسکال انجام شد. عصاره زعفران داخل ستون تزریق شده و با جریان فاز متحرک (متانول و آب) با دبی ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه شسته شد. برای به دست آوردن اجزای کروسین با خلوص بالا، ابتدا عصاره در دمای ۴۰°C و در تاریکی با استفاده از تبخیرکننده چرخان تغلیظ شده و سپس از یک ستون حاوی مواد بسته‌بندی با متانول آبی به عنوان فاز متحرک عبور داده شد. خلوص کروسین با HPLC - فرابنفش مرئی بررسی شد. نتایج نشان داد هنگامی که از سیلیکاژل استفاده شد، خلوص کروسین ۱ کمتر از ۹۵٪ بود زیرا کروسین بسیار قطبی بود و درمقابل، مخلوطی از همبسپار استایرن- دی وینیل بنزن و بسپارهای نشاسته اصلاح شده به عنوان فاز ثابت با محلول اتانول آبی به عنوان فاز متحرک، به افزایش خلوص کروسین بالاتر از ۹۶ درصد انجامید. اندازه ذرات بهینه، مساحت سطحی کارآمد و اندازه منافذ مناسب، به ترتیب، ۶۰/۴ میکرومتر، ۱۵۳/۶ مترمربع بر گرم و ۸/۰۷ آنگسترم بود. بهترین گرادیان برای فاز متحرک برای حداکثر تعداد اجزای جداشده، متانول آبی ۵۰ تا ۹۵ درصد بود. تأثیر ترکیب فاز متحرک نیز نشان داد استفاده از روش جداسازی اولیه برای ۱ گرم کلاله به تولید ۴۰ میلی گرم کروسین ۱، ۲۰ میلی گرم کروسین ۲ و ۸ میلی‌گرم کروسین ۳ منجر شد[۲۷].

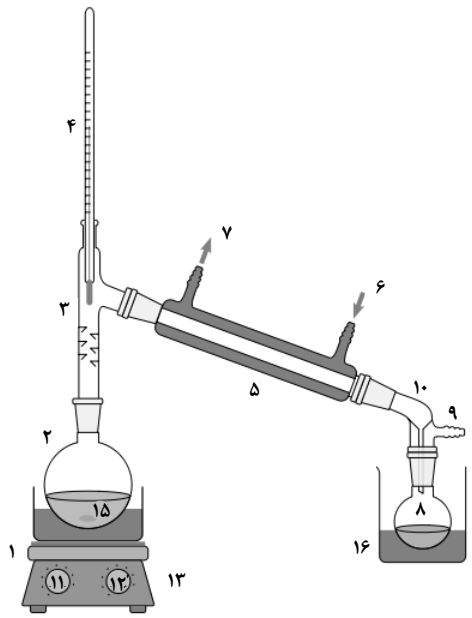
یانگ و همکاران (۲۰۰۹) استخراج کروسین از میوه گاردنیا با روش خیساندن را ارزیابی و بررسی کردند. هر نمونه ۲ بار با استفاده از آب ۶۰°C و به مدت ۲ ساعت استخراج می‌شود. سپس عصاره‌ها از صافی گذرانده و در سانتریفیوژ نهاده شدند و رویه با استفاده از تبخیرکننده چرخان تغلیظ و عصاره خام گاردنیا با بهره‌گیری از سامانهٔ ریزصافش تیمار شد. کروسین در ریزصافی با بهره‌گیری از یک غشاء پلی آمیدی تغلیظ و برای جذب کروسین با رزین، ابتدا رزین‌ها با استفاده از اتانول ۹۵٪ و سپس با آب مقطر شستشو داده و خشک شد. برای آزمایش جذب، ۰/۵ گرم نمونه از هر رزین در الکل ۹۵٪ به مدت ۲۴ ساعت خیسانده و با بهره‌گیری از آب مقطر تا حذف کامل اتانول شستشو داده شد. سپس، همراه با ۸۰ میلی لیتر از عصاره خام یا ریزصافی شده به یک منتفل شده و در یک حمام آب ۲۵°C همزده شد. در بازه‌های زمانی مشخص، میزان کروسین در عصاره اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیقات نشان داد عصاره خام گاردنیا حاوی حدود ۰/۷۸ گرم بر لیتر کروسین و حدود ۸۸/۵٪ از آن به وسیله ریزصافش جدا می‌شود[۲۸]. گروهی دیگر از محققان استخراج کروسین از میوه گاردنیا را با روش خیساندن ارزیابی کردند. در این تحقیق، مقدار ۰/۵ گرم نمونه در داخل هاون ریخته شده و با ۷۰۰ میکرولیتر Tris–HCl مخلوط و خرد شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرار گرفت. در ادامه ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن افزوده شد. سپس مجددا محلول به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرار گرفته و داخل سانتریفیوژ نهاده شد. فاز آبی حاوی کروسین در بالا در فریزدرایر خشک و فاز پایینی (کلروفرم) تبخیر شد. برای آنالیز HPLC از ستون RP-C18 بهره گرفتند[۳۰و۲۹].

1. Zarghami and Heinz
2. Iborra
3. Sarfarazi

۴-۲ روش‌های جدید

۴-۲-۱ تقطیر بخار

تقطیر بخار یکی از روشهای با ارزش برای جداسازی ترکیبات فرار مانند اسانس‌های روغنی از گیاهان به‌شمار می‌آید (شکل (۷)). تاکنون از روش‌های تقطیر بخار، ریزاستخراج همزمان حلال-تقطیر بخار[1] و روش فضای سر در خلاء[2] استفاده و ترکیباتی شامل ۲،۶،۶- تری متیل-۱،۳- سیکلوهگزیدین-۱- کربوکسالدهید (سافرانال)، ۳،۵،۵- تری متیل-۲- سیکلوهگزن-۱- یک (ایزوفورن)،- تری متیل-۳- سیکلوهگزن-۱- یک (ایزومر ایزوفورن) و ۲،۶،۶- تری متیل-۲- سیکلوهگزن-۱،۴- دی ان و ۲،۶،۶- تری متیل-۱،۴- سیکلوهگزیدین-۱- کربوکسالدهید (ایزومر سافرانال) شناسایی شده است[۳۱و۲۲].



شکل ۷. استخراج‌کننده تقطیر بخار؛ ۱. گرمکن؛ ۲. بالن تقطیر؛ ۳. برج تقطیر؛ ۴. دماسنج (برای تعیین دمای جوش)؛ ۵. سردکن؛ ۶. ورودی آب سرد؛ ۷. خروجی آب سرد؛ ۸. بالن جمع‌آوری محصول؛ ۹. ورودی گاز یا خلاء؛ ۱۰. جمع‌آوری‌کننده بخارات؛ ۱۱. تنظیم‌کننده گرما؛ ۱۲. تنظیم‌کننده سرعت همزن؛ ۱۳. صفحه گرمکن؛ ۱۴. حمام روغن یا شن؛ ۱۵. همزن؛ ۱۶. حمام آب سرد[۳۲].

۴-۲-۲ استخراج با کمک فراصوت

امروزه فراصوت روشی نو و امید بخش در صنایع غذایی به شمار می‌آید. توان به کار رفته در این فناوری منجر به تغییر خواص و پارامترهای مواد غذایی در محیطهای آبی (از طریق کاواک‌زایی) و در محیطهای گازی (از طریق برقراری شدت بالای میدان صوتی) منجر می‌شود. آثار مکانیکی، شیمیایی و زیست‌شیمیایی ایجاد شده در محصولات غذایی به شدت انتشار امواج فراصوت در محیط بستگی دارد. غیر فعال‌سازی ریزاندامگانها و آنزیم‌ها در حفظ و نگهداری محصولات غذایی و دفع آلودگی از مواد غذایی از طریق انتشار امواج فراصوت (به‌تنهایی و یا ترکیبی با انرژی گرمایی و تکنیک‌های فشار بالا) انجام می‌گیرد. به علاوه، از این روش می‌توان در فرایندهای مختلف غذایی چون مخلوط کردن مواد، تبلور، گاززدایی، استخراج مواد، صافش، انجماد، خشک کردن، انتقال جرم، تسهیل در اکسایش و دیگر فرایندهای غذایی به گستردگی بهره گرفت. استخراج ترکیبات مختلف با فناوری فراصوت نسبت به روش‌های سنتی از مزیتهای نسبی برخوردار است:

۱. نفوذ حلال به داخل سلول‌ها

۲. بهبود انتقال جرم

۳. تخریب زیستی سلول‌ها در سطح و داخل گیاهان برای تسریع پخش و انتشار مواد داخل سلولی.

حلال‌های به کار رفته برای استخراج ترکیبات زیست فعال زعفران در فراصوت، باید براساس تعداد ترکیبات و بیشینهٔ مساحت آنها در کروماتوگرام یونی کلی[3] (TIC) انتخاب شود؛ بنابراین قطبیت حلال، گرانروی و وزن مولکولی در این حوزه عوامل مهمی به‌شمار می‌آیند. از سوی دیگر، هنگامی که از سامانه‌های دوتایی برای استخراج بهره می‌گیرند، میزان قطبیت افزایش می‌یابد که بر بازده استخراج از طریق فراصوت تأثیر می‌گذارد. ترکیب متانول و اتیل استات دارای بازده بالاتری در استخراج ترکیبات زیست فعال زعفران با فراصوت نسبت به ترکیب متانول/ اتر و متانول/ کلروفرم است. دلیل اصلی این امر کارایی بالای این حلال‌ها در تشکیل حباب طی فرایند است[۹]. ترکیبات فعال زعفران با بهره‌گیری از فراصوت با توان بالا در بسامد ثابت ۳۰ کیلوهرتز استخراج و تأثیر عوامل مختلف شامل شدت صوت، زمان و روش سونیکاسیون در دمای ۲۰°C بر بازده استخراج، بررسی شده است. بهره‌گیری از فناوری فراصوت به بهبود چشمگیری در بازده استخراج ترکیبات زیست فعال زعفران نسبت به روش‌های سنتی مانند استخراج با آب سرد می‌انجامد. پی برده‌اند

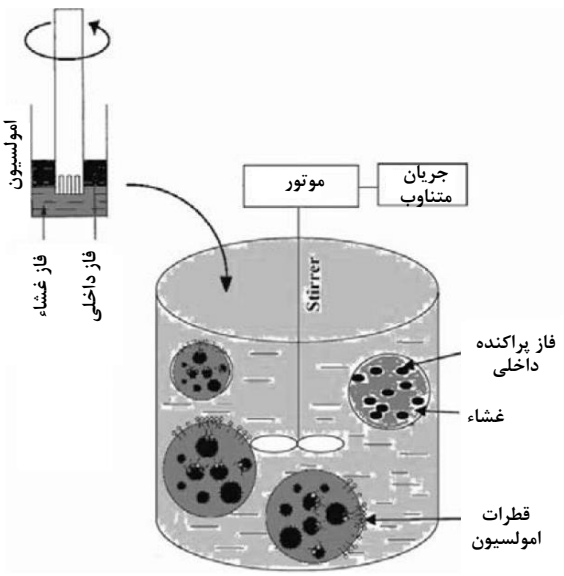
1. Microsimultaneous Steam Distillation–Solvent Extraction
2. Vacuum Head Space
3. Total ion Chromatograms

که بهره‌گیری از روش فراصوت پالسی با دوره‌های زمانی کوتاه نسبت به حالت پیوسته کارایی بیشتری دارد[۳۳]. از این فناوری می‌توان برای استخراج ترکیبات فرار زعفران و نیز کروستین بهره برد[۳۵و۳۴]. کدخدایی و همتی[1] (۲۰۰۶) استخراج ترکیبات فعال زعفران با بهره‌گیری از فراصوت با توان بالا با بسامد ثابت ۳۰kHz را بررسی می‌کردند. تأثیر شدت صوتی، زمان و نحوه سونیکاسیون روی بازده استخراج سه ترکیب اصلی زعفران در ۲۰°C بررسی شد. کارایی فرایند با روش استخراج با آب سرد ارائه شده در استاندارد ایزو[۲۰] مقایسه شد. بنابر نتایج این بررسی، فراصوت سرعت استخراج را به میزان چشمگیری افزایش و در نتیجه زمان فرایند را کاهش داده است. بازده استخراج با افزایش زمان و دامنه سونیکاسیون افزایش یافت. نیز مشخص شد که کاربرد فراصوت پالسی با بازه‌های پالس کوتاه نسبت به سونیکاسیون پیوسته کارایی بالاتری داشت[۳۳].

فرا و همکاران (۲۰۱۴) استخراج ترکیبات زعفران با استفاده از فناوری فراصوت را بررسی کردند. در مرحله استخراج یک گرم زعفران با بهره‌گیری از اتانول ۵۰٪ (۱۰۰ میلی‌لیتر) و در دمای اتاق در، سونیکاتور با بسامد ۳۳ کیلوهرتز استخراج شد. سپس عصاره به دست آمده در سرعت ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴°C را به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ نهادند و از کاغذ صافی گذراندند. ترکیبات استخراج شده شامل کامفرول- دیگلیکوزید، کروسین ۴، کروسین ۳، کروسین ۲، کروسین ۴ (سیس) و کروسین ۳ (سیس) بود[۳۶].

۴-۲-۳ غشای مایع امولسیون[2] (ELM)

غشای مایع امولسیون (ELM) به یکی از بهترین روش‌های جداسازی برای استخراج آلودگی‌های فلزی و گونه‌های مولکولی به‌شمار می‌آید و به صفاتی چون سرعت بالای انتقال جرم، حساسیت زیاد، نیاز به حلال کم و سرمایه گذاری پایین شناخته شده است (شکل (۸)). فرایند ELM شامل فاز غشاء، فاز پراکنده یا داخلی و خوراک یا فاز خارجی است. هردو فاز محلول‌های آبی‌اند درحالیکه فاز غشاء یک مایع آلی و مقداری آبگریز است که با فاز پراکنده یک لایه نازک مرزی تشکیل می‌دهد. معمولاً فاز آبی خوراک حاوی ترکیبی است که باید استخراج شود. معمولاً فاز غشاء با هیچ یک از دو فاز خوراک و فاز پراکنده قابل آمیختگی نیست و معمولاً حاوی افزودنی‌ها (حامل) و عوامل سطحی است که معمولاً چنان اختیار می‌شوند که به افزایش گزینش پذیری، پایداری و تراوایی لایه غشاء انجامد. با بهره‌گیری از ELM این امکان فراهم می‌آید که بتوان با بهره‌گیری از عوامل بیشتر، تعداد بیشتری از ترکیبات را استخراج کرد. از سوی دیگر، یکی از معایب روش‌های استخراج با حلال، استفاده از سرعت بالای همزن (تا ۱۰۰۰ rpm) برای مخلوط کردن دوفاز است، اما در ELM از سرعت‌های پایین (۳۰۰ RPM و بالاتر) استفاده می‌شود. در فرایند استخراج ترکیبات زعفران با تکنیک ELM، بهترین غشاء N- دکان، بهترین عامل سطحی اسپان ۸۰، غلظت عامل سطحی ۲/۵٪ (وزنی)، نسبت حجمی فاز امولسیون به فاز خوراک ۰/۳، حجم محلول عریان به حجم غشاء ۰/۸، و سرعت مخلوط کردن ۳۰۰ rpm است. تحت این شرایط، بازده استخراج حدود ۹۶٪ و ترکیبات استخراج شده شامل پیکروکروسین، سافرانال و کروسین‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ بود[۳۷].



شکل ۸. نمایی از سامانهٔ ELM [۳۷].

۴-۲-۴ استخراج با سیال فوق بحرانی[3]

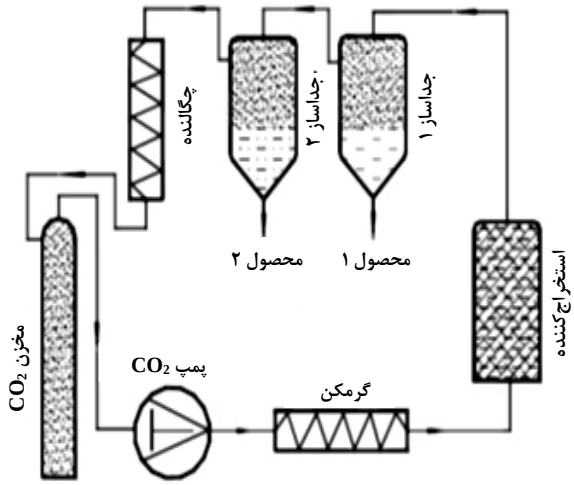
سیال فوق بحرانی ترکیبی است که بیش از دما و فشار بحرانی‌اش (Pc,Tc) فشرده و گرم شده باشد. خاصیت و ماهیت سیال فوق بحرانی از نظر ترمودینامیکی از این قرار است که هم

1. Kadkhodaee and Hemmati
2. Emulsion Liquid Membran
3. Supercritical Fluid Extraction (SCF)

شبیه گازهاست (با ضریب نفوذ زیاد) و هم شبیه مایعات است و حلالیت پردامنه‌ای برای ترکیبات برخوردار است. این فاز دارای قدرت حلالیتی در حدود مایع است، در حالی که خصوصیات انتقال معمول در گازها را دارد. گرانروی پایین سیال فوق بحرانی به همراه قدرت نفوذ بالای آن، در کنار نیروی شناوری بسیار زیاد که سبب چگالی بسیار بالایی در فصل مشترک می‌شود، به بروز خصوصیات انتقال جرم بهتر این سیال در مقایسه با حلال‌های معمولی می‌انجامد. رفتار حلالیت سیال به فاز مایع نزدیک است و این در حالی است که نفوذ در جامد از طریق خصوصیات انتقالی مشابه گاز سیال فراهم می‌شود. در نتیجه، سرعت استخراج و جداسازی فازی می‌تواند به نحو چشمگیری سریع‌تر از حالتی شود که فرایند استخراج به طور متعارف صورت می‌شود (شکل (۹)). نکته درخور توجه صفر بودن کشش سطحی یک SCF است؛ این امر رسیدن به اعماق سوراخ‌های ریز روی یک ماده جامد را تسهیل می‌کند. از مزایای عمدهٔ استخراج SCF آن است که حلالیت جزء حل شده در یک حلال با دما و فشار تغییر می‌کند. حلال‌هایی که سیال فوق بحرانی به کار می‌روند، باید خصوصیاتی از جمله: حلالیت خوب، بی‌اثر بودن بر محصولات، غیرسمی بودن، خورنده نبودن، جداسازی آسان از محصولات، ارزان بودن و فشار بحرانی پایین به دلیل مقاصد اقتصادی را داشته باشند. سازگاری با محیط زیست علاوه بر شرایط یادشده، یک سیال فوق بحرانی را به شدت مورد توجه قرار می‌دهد که در این میان کربن‌دی‌اکسید بسیار درخور توجه است. علت این امر آن است که این ماده دارای ثابتهای بحرانی قابل دسترسی است[۳۸].

از روش SCF می‌توان برای استخراج ترکیبات زیست فعال زعفران بهره برد، اما بیشتر تحقیقات انجام شده روی سافرانال متمرکز بوده است[۴۰و۳۹]. پی برده‌اند که به منظور افزایش بازده استخراج ترکیبات زعفران با این روش، چگالی سیال فوق بحرانی باید کاهش یابد. دلیل این امر افزایش قدرت نفوذ حلال فوق بحرانی به داخل سلول است[۳۹].

نروم[1] و همکاران (۲۰۱۶) استخراج ترکیبات زیست فعال زعفران با بهره‌گیری از کربن‌دی‌اکسید فوق بحرانی و آب و متانول به عنوان حامل[2] را بررسی کردند. استخراج در دماهای ۴۰ تا ۸۰°C، فشار ۲۰



شکل ۹. سامانهٔ استخراج با سیال فوق بحرانی[۳۲].

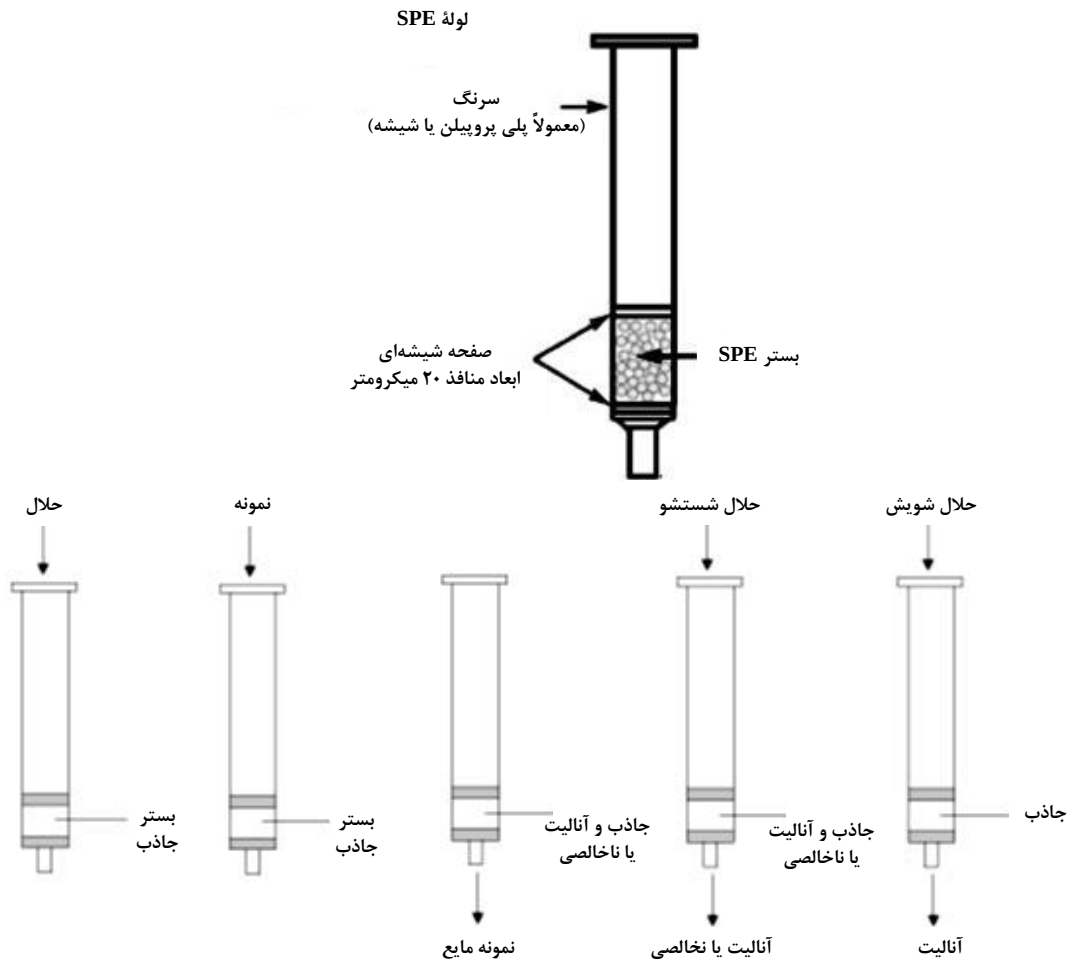
و ۴۰ مگاپاسکال و دبی کربن‌دی‌اکسید ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد. در هربار اجرای دستگاه، حدود ۰/۵ گرم پودر زعفران مصرف شد. پس از بازه‌های زمانی ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه، نمونه‌برداری انجام و بلافاصله از طریق HPLC آنالیز شد. نتایج نشان داد میزان استخراج تمام ترکیبات با افزایش دما افزایش می‌یابد. دلیل این امر می‌تواند افزایش فشار بخار آب مناسب با افزایش دما و در پی آن افزایش قطبیت کربن‌دی‌اکسید باشد؛ مخلوط آبی هم افزایش یافته که این امر موجب افزایش حلالیت ترکیبات فعالی چون کروسین می‌شود. فشار بخار ترکیبات حل شده نیز با افزایش دما افزایش می‌یابد که باعث افزایش حلالیت در دمای بالاتر می‌شود. استخراج با آب به وجود گروه گلیکوزیل سبب استحصال مقدار بیشتری از پیکروکروسین و آلفا کروسین می‌شود. از سوی دیگر، استخراج با متانول سبب استحصال مقدار بالاتری از سافرانال و کروسین دی گلیکوزید می‌شود. در مقایسه بین آب و متانول، آب بازده استخراج بالاتری داشت. در خصوص فشار نیز روندی مانند دما مشاهده شد؛ از این قرار که با افزایش فشار تا میزان مشخصی بازده استخراج ترکیبات فعال به دلیل افزایش حلالیت افزایش پیدا کرد. اما با افزایش بیشتر فشار این روند معکوس شد، به طوری که میزان استخراج ترکیبات در فشار ۳۰ مگاپاسکال حدود ۲ برابر ۴۰ مگاپاسکال بود. دلیل این مشاهدات می‌تواند تغییرات ساختاری ترکیبات در فشار بالا باشد. برای آلفا کروسین و دی گلیکوزید کروسین فشار بهینه ۳۰ مگاپاسکال بود[۴۱].

1. Nerome
2. Entrainer

۴-۲-۵ استخراج فاز جامد۱ (SPE)

در این فناوری اغلب آماده‌سازی نمونه شامل یک مرحله تغلیظ است که در آن غلظت آنالیت تا بالاتر از حد شناسایی تکنیکی افزایش می‌یابد که از آن استفاده می‌شود. تکنیک‌های تغلیظ متداول شامل استخراج فاز جامد، مایع و گازی است. یکی از الزامات اولیه مورد بررسی، کاهش میزان حلال آلی به کار رفته است. SPE شامل جذب سطحی آنالیت بر یک جاذب جامد (فاز ثابت آمینوپروپیل یا اکتادسیل پیوندیافته با سیلیکاژل) و در پی آن، شستشو با یک حلال مناسب است[۴۲]. مراحل فرایند SPE را در شکل (۱۰) مشاهده کنید. ابتدا، کارتریج با استفاده از یک حلال تیمار می‌شود تا حلال مرطوب شود. سپس محلول حاوی آنالیت داخل فاز جامد به مرحلهٔ اجرا درمی‌آید و فعال می‌شود[۴۳].

در حالت آرمانی، آنالیت (مادهٔ مورد تجزیه) همراه مقداری ناخالصی جذب فاز جامد می‌شود. برای جداسازی ناخالصی‌ها، فاز جامد را شستشو می‌دهند. آنالیت در خلال این مرحله جمع‌آوری می‌شود. مزیت عمدهٔ روش SPE نسبت به روش استخراج مایع/ مایع، کاهش معنی دار میزان حلال به‌کار رفته است[۴۴]. جاذب‌های موجود نه تنها برای جداسازی آنالیت، بلکه در مواردی برای جداسازی ترکیبات مداخله‌گر نیز به‌کار گرفته می‌شوند. تکنیک SPE امروزه دارای کاربردهای زیادی بخصوص در جداسازی پروتئین‌ها و پپتیدهاست[۴۶و۴۵]. در SPE فازهای ثابت غیرقطبی مورد استفاده قرار گرفته[۴۶] و معمولاً همراه با HPLC و الکتروفورز به‌کار گرفته می‌شود[۴۸و۴۷].



شکل ۱۰. یک نوع لوله استخراج فاز جامد (بالا) مراحل استخراج فاز جامد (پایین).

1. Solid Phase Extraction

از تکنیک SPE برای جداسازی ترکیبات زعفران، مانند پیکروکروسین استفاده شده است[۴۹]. در این تحقیق پارامترهای موثر بر فرایند SPE شامل غلظت اولیه عصاره، میزان نمونه و شوینده تزریق شده بررسی و بهینه‌سازی شد. بنابر نتایج به دست آمده، غلظت بهینه عصاره زعفران ۰/۵ گرم بر لیتر و حجم تزریق ۴ میلی‌لیتر بوده و استونیتریل ۵٪ (حجمی/حجمی) نیز به عنوان شوینده به میزان ۷۳ میلی‌لیتر به‌کار گرفته شد. این تکنیک در مباحث پزشکی و برای اندازه‌گیری میزان کروسیتین در پلاسما، قبل و بعد از مصرف چای زعفرانی، به‌کار برده شده و از مخلوط آب/ متانول / اسید تری فلورواستیک به عنوان فاز متحرک استفاده شده است[۵۰]. به منظور جداسازی و استخراج ترکیبات شیمیایی هدف و بهبود عامل تغلیظ، جاذب‌های جدید جامد مانند بسپارهای نشاندار مولکولی با بهره‌گیری از جنتوبیوز به عنوان الگو و برای جداسازی کروستین زعفران تولید شده است.

در مطالعه دیگری، بطحایی و همکاران (۱۳۸۵) تخلیص کروسین با روش SPE را بررسی کردند. عصاره‌گیری از پودر زعفران به روش خیساندن در تاریکی و در دمای اتاق با هگزان نرمال و سپس اتانول ۵۰٪ در دمای اتاق با هگزان نرمال و سپس اتانول انجام شد. ستون را ابتدا با اتانول ۵۰٪ و سپس اتانول ۵۰٪ و اسید استیک شستشو دادند. در لوله‌های اولیه پیکروکروسین‌ها جمع‌آوری و سپس مجموعهٔ کروسین‌ها از ستون خارج شد. مراحل جداسازی اجزاء از طریق روش TLC نیز پیگیری شد. عصاره‌ها منجمد و خشک شدند. برای جداسازی نوع غالب کروسین از سایر کروسین‌ها، پس از حل شدن پودر کروسین‌ها در حلال، از ستون سیلیکاژل-۶۰ و از اتیل استات: اتانول: آب با نسبت حجمی ۱۰:۳:۲ به عنوان فاز متحرک استفاده شد. شکل عمدهٔ کروسین با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک نیز جدا شد که نتایج مشابهی با روش قبل به دست آمد. اجزای به دست آمده توسط دستگاه لیوفیلیز(حلال‌دوست)کننده به پودر تبدیل و در فریزر نگهداری شد. این محققان برای تولید دی متیل کروستین، عصاره‌گیری پودر زعفران را، به ترتیب، با هگزان، دی اتیل اتر و متانول ۸۰٪ با بهره‌گیری از سیستم سوکسیله انجام دادند. ترکیب دی متیل کروستین (به منظور افزایش مقدار آن) توسط هیدرولیز قلیایی عصاره حاصل با پتاس ۱۰٪ انجام شده و تخلیص توسط عصاره‌گیری با دی کلرومتان صورت گرفت. برای تخلیص، تبلور در حضور دی کلرومتان: دی اتیل اتر (۵۰:۵۰) انجام شد. برای جداسازی کروستین، عصاره گیری پودر زعفران با آب در دمای ۷۰ سلسیوس انجام شد و سپس pH محلول با اسید کلریدریک به ۱ رسانده شد. پس از تغلیظ تحت خلاء، کروستین توسط دسیکاتور خشک شد. عمل تخلیص با آب و اسید کلریدریک انجام گرفت. رسوب را در تاریکی در دمای ۴°C ذخیره کردند. خلوص و شناسایی ساختار تمام اجزای جدا شده با استفاده از روشهای طیف نورشکاری، TLC، HPLC، طیف‌سنجی فروسرخ، طیف‌سنجی تسویه مغناطیسی هسته، و اندازه‌گیری نقطهٔ ذوب آنها انجام شد[۵۱].

بولحسنی[1] و همکاران (۲۰۰۵) به بررسی جداسازی پیکروکروسین و کروسین با روش SPE پرداختند. در این مطالعه ۴ گرم پودر کلاله با ۲۰ میلی لیتر n-هگزان مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی همزده شد. عصاره در سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ قرار گرفت. این فرایند ۳ بار تکرار شد. سرانجام جزء لیفی باقیمانده ۲ بار با اتانول ۵۰٪ استخراج و در سانتریفیوژ قرار داده شد (۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه). رویه داخل یک ستون (۸۰ × ۲ سانتی‌متر) که حاوی آلومینیم اکسید خنثی (active ۹۰) بود، تزریق شد. سپس با ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪ و در پی آن با مخلوط اتانول ۵۰٪: استیک اسید (۱:۴ حجمی/حجمی) شستشو داده شد. ۴ میلی لیتر از اجزاء جداسازی و جذب آن در ۲۵۰ و ۴۴۰ نانومتر قرائت شد. پیکروکروسین جزء اول و کروسین جزء بعدی بود[۵۲].

مهاجری[2] و همکاران (۲۰۱۰) استخراج و خالص‌سازی کروسین از زعفران با استفاده از استخراج فاز جامد بسپار نشاندار شده مولکولی را بررسی کردند. در این مطالعه، میزان ۱۰ گرم پودر زعفران در ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در دمای ۰°C به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، رویه جدا شده و در تاریکی و دمای ۱۰°C- نگهداری شد. مجموعاً ۲۵ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰٪ به رسوب سانتریفیوژ اضافه و فرایند تکرار شد. مرحله استخراج را ۳ بار تکرار کردند. حجم کل حلال به‌کار رفته برای استخراج ۱۰ گرم زعفران، ۲۰۰ میلی‌لیتر بود. این محلول در یک ظرف شیشه‌ای با دیواره ضخیم منتقل و به مدت

1. Bolhasani
2. Mohajeri

۲۴ ساعت در دمای ۵°C- نگهداری شد. بلورهای کروسین جدا و به منظور حذف آب با استون شستشو داده شد. وزن بلور به دست آمده ۱/۷ گرم بود. بلورها مجدداً در ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ حل و به مدت ۲۰ روز در ۵°C- نگهداری شد. وزن نهایی بلور به دست آمده در این روش ۱/۰۲ گرم بود. برای خالص‌سازی از بسپار نشاندار جنتوبیوز بهره گرفتند. برای تهیه این بسپار از جنتوبیوز، متاکریلامید، متیل سولفوکسید (DMSO)، اتیلن گلایکولیدی متاکریلات و ۲،۲، آزو- بیس- ایزو- بوتیرونیتریل بهره‌گرفتند. بنابر نتایج به‌دست آمده، بهترین حلال برای برقراری پیوند استیک اسید ۲٪ بود[۵۳].

در مطالعه‌ای، کاربرد استخراج با فاز جامد (SPE) در اندازه‌گیری پیکروکروسین به کمک طیف نورنگاری UV-Vis بررسی شد. عوامل تأثیرگذار بر روند SPE مثل غلظت عصاره اولیه، اندازه نمونه و حلال‌ها مطالعه و بهینه شدند. نتایج حاصل قابلیت انتخابی بودن، درستی، حالت خطی، دقت و بازیابی مناسب (۹۰٪) این فرایند را نشان دادند. در این تحقیق، برای جداسازی پیکروکروسین ۳۰ ml سیکلوهگزان به ۵ g از نمونه زعفران پودری اضافه شد و سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری و توأم با هم زدن مقطعی نگهداری شد. سپس حلال آلی تخلیه و پسماند جامد تحت فشار تقلیل یافته خشک شد. سپس ۶۰ml آب اشباع شده با نیتروژن به این پسماند افزوده و سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی و در دمای اتاق هم زده شد. سپس این عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰rpm قرار داده و بخش رویه جمع آوری و از صافی گذرانده شد[۴۹].

۴-۲-۶ تبلور

هادیزاده و مهاجری[1] (۲۰۱۰) به بررسی استخراج و خالص‌سازی کروسین زعفران با بهره‌گیری از روش تبلور پرداختند. اتانول ۸۰٪ به عنوان بهترین حلال انتخاب شد. فرایند تبلور در دو مرحله در دماهای متفاوت صورت گرفت. از اتانول ۸۰٪ به عنوان بستر تبلور سودجستند. خلوص بلورهای کروسین حاصل از اولین مرحله تبلور کم بود و بنابراین تحت دومین مرحله تبلور قرار گرفتند. در این مرحله در ۵°C- بلورهای خالص‌تری به دست آمدند. با بهره‌گیری از طیف نورنگاری UV-Visible و HPLC خلوص بلورهای کروسین با کروسین تولید شده توسط شرکت فلوکا[2] و عصاره متانولی زعفران مقایسه شد. بنابر نتایج به دست آمده، خلوص این بلورها حدود ۱۳ برابر محصول فلوکا بود. خلوص کل کروسین بلوری در این مطالعه بیش از ۹۷٪ بود[۵۴].

هادیزاده و همکاران[3] (۲۰۱۰) استخراج و خالص‌سازی کروسین از زعفران با روش تبلور را بررسی کردند. در این مطالعه، میزان ۱۰ گرم پودر زعفران با ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در دمای ۰°C و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. پس از قرار دادن در سانتریفیوژ (۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) رویه جدا شد و فرایند استخراج برای رسوب به همین صورت ۶ بار تکرار شد. بنابراین، ۲۰۰ میلی‌لیتر عصاره از ۱۰ گرم زعفران به دست آمد. این محلول به مدت ۲۴ روز در دمای ۵°C- نگهداری شد. پس از این مدت، بلورهای تولیدی به منظور حذف آب با استون شستشو داده شد. ۱/۷ گرم بلور به دست آمد. درمرحله بعد، این بلورها در ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ حل و در دمای ۵°C- به مدت ۲۰ روز برای تبلور مجدد نگهداری شد. میزان نهایی بلورها ۱/۰۲ گرم بود. نتایج این تحقیق نشان داد میزان کروسین به دست آمده در مرحله اول تبلور ۱۷٪ با خلوص ۸۵٪، اما در مرحله دوم ۱۰٪ با خلوص ۹۷٪ بود[۵۴].

۴-۲-۷ سامانهٔ آبی دوفازی

مونتاولو- هرناندز[4] و همکاران (۲۰۱۲) بازیافت کروسین از کلاله زعفران در سامانه‌های آبی دو فازی را بررسی کردند. در این تحقیق مخلوط‌های مختلفی از پلی اتیلن گلایکول (PEG) با پتاسیم فسفات، PEG با دکستران (DEX)، محلول‌های یونی پتاسیم فسفات با سدیم فسفات و اتانول با پتاسیم فسفات به کار رفت. بنابر نتایج حاصل، درخصوص کروسین آثار مطلوبی با سامانهٔ دوفازی PEG- پتاسیم فسفات به دست آمد. اتانول ۵۰٪ در دمای ۲۵°C دارای بالاترین بازده بازیافت معادل ۷۶/۸۹٪ بود. نتایج نشان داد بالاترین بازده برای بازیافت کروسین سامانهٔ اتانول- پتاسیم فسفات است. بررسی تأثیر مقدار سدیم کلراید بر میزان بازیافت کروسین در سامانهٔ اتانول (۱۹/۸٪ وزنی/ وزنی)-

1. Hadizade and Mohajeri

2. Fluka
3.Hadizade
4. Montalvo-Hernández

فسفات (۱۶/۵٪ وزنی / وزنی) نشان داد که بالاترین درصد بازیافت معادل ۷۹/۲۷٪ در غلظت ۰/۱ مولار نمک طعام به دست آمد. مقایسه بین مقدار بازیافت کروسین بین سامانهٔ تک حلالی اتانول و سامانهٔ دوحلالی نشان داد که بالاترین میزان بازیافت در سامانهٔ دوحلالی و معادل ۸۹/۸٪ به دست می‌آید در حالی که این مقدار در سامانهٔ اتانولی ۷۶/۸۹٪ گزارش شد. نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از سامانهٔ دو حلال آبی نسبت به سامانهٔ تک حلالی دارای گزینش‌پذیری بالاتری است و کروسین استحصال شده با این روش دارای خلوص نسبی بالاتری نیز هست[۵۵].

۴-۲-۸ تله سرمایی[1]

با توجه به این‌که سافرانال نوعی روغن فرار است، برای جداسازی آن باید از تله سرمایی سودجست. برای جداسازی سافرانال، ۳ گرم زعفران را دو بار با استفاده از آب ۷۰°C استخراج و در سانتریفیوژ (۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه) قرار دادند. pH رویه به وسیله HCL به ۱ رسانده شد و تحت شرایط همزدن به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۰°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس عملیات تغلیظ با تبخیرکننده چرخان انجام شد. ترکیبات فرار (عمدتاً سافرانال) در یک تله سرمایی (-۷۸°C) جداسازی شد[۱۲].

گروهی از پژوهشگران، برای استخراج سافرانال از زیره استفاده کردند. در این روش، ۱۰ گرم پودر زیره در صافی کاغذی قرار داده و عملیات استخراج با روش‌های مختلف (استخراج با سوکسله، استخراج با استفاده از فراصوت، استخراج با استفاده از پیش تیمار میکروموجی و فراصوت، استخراج با استفاده از پیش تیمار خشک کردن و فراصوت و استخراج با استفاده از پیش تیمار آنزیمی و فراصوت) با استفاده از ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ (نقطه جوش ۶۸°C) برای ۱۶ ساعت انجام شد. بیشترین بازده استخراج با استفاده از متانول به دست آمد. بالاترین بازده استخراج مربوط به روش سوکسله بود اما با درنظر گرفتن زمان و مسائل اقتصادی، روش استخراج با پیش تیمار میکروموجی و فراصوت مناسب‌ترین روش به شمار آمد. زعفران مورد آزمایش دارای میزان سافرانال کمتری نسبت به زیره بود[۵۶].

۵. نتیجه‌گیری کلی

زعفران گرانقیمت‌ترین ادویه دنیاست و به واسطه دارا بودن ترکیبات خاص خود دارای کاربردهای زیادی در صنایع غذایی است. خواص دارویی ترکیبات زیست‌فعال آن نیز سبب شده از این ادویه به طور گسترده در صنایع داروسازی بهره گیرند. از این‌رو، دستیابی به حداکثر بازده استخراج ترکیبات زعفران یکی از چالش‌های عمده در صنایع مربوطه به‌شمار می‌آید. روش‌های مختلفی برای استخراج و خالص‌سازی ترکیبات زیست فعال زعفران وجود دارد که به دو دسته سنتی و جدید طبقه‌بندی می‌شوند. در فرایند استخراج، هرچه دما کمتر و زمان کوتاه‌تر باشد، صدمه به ترکیبات و کیفیت عصاره تولیدی نیز کاهش خواهد یافت؛ از این‌رو روش‌های نو مانند سیال فوق بحرانی، به‌واسطه استفاده از دمای پایین و زمان کوتاه و همچنین بالاتر بودن بازده استخراج، نسبت به روش‌های سنتی ارجح‌ترند.

مراجع

[1] Kheirandish, M., Sriramapa, K.., "Production and export potential of saffron in Iran", Asian Journal of Development Matters, 2010. 4(3).

[2] Xi, L., Qian, Z., Xu, G., Zheng, S., Sun, S., Wen, N., Sheng, L., Shi, Y., Zhang, Y., "Beneficial impact of crocetin, a carotenoid from saffron, on insulin sensitivity in fructose-fed rats", The Journal of nutritional biochemistry, 18(1), pp.64-72 (2007).

[3] Mashmoul, M., Azlan, A., Yusof, B. N. M., Khaza'ai, H., Mohtarrudin, N., Boroushaki, M. T., "Effects of saffron extract and crocin on anthropometrical, nutritional and lipid profile parameters of rats fed a high fat diet", Journal of Functional Foods, 8, 180-187, (2014).

[4] Akhondzadeh, S., Sabet, M. S., Harirchian, M. H., Togha, M., Cheraghmakani, H., Razeghi, S., Zare, F., "Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial", Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 35(5), 581-588, (2010).

[5] Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., Rajabzadeh, G., "Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials", Food Hydrocolloids, 51, 327-337, (2015).

[۶] هاشمی، ن.، ربیعی، ح.، توکلی‌پور، ح.، گازرانی، س.، "بررسی اثر جایگزینی قند گیاه استویا (Stevia rebaudiana) با ساکارز بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شربت رژیمی زعفران"، نشریه علمی پژوهشی زراعت و فناوری زعفران، ۲(۴): ص. ۳۰۳-۳۱۰، (۲۰۱۵).

1. Cold Trap

[7] Behnia, M., "Saffron cultivation", Tehran University Publication (In Persian), pp.112-127, (1991).
[8] Amin, B., Hosseinzadeh, H., "Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, Crocus sativus L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats", Fitoterapia, (5):83, p. 888-895, (2012).
[9] Jalali-Heravi, M., Parastar, H., Ebrahimi-Najafabadi H., "Characterization of volatile components of Iranian saffron using factorial-based response surface modeling of ultrasonic extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis", Journal of Chromatography A, 1216(33): p. 6088-609, (2009).
[10] Gregory, M. J., Menary, R. C., Davies, N. W., "Effect of drying temperature and air flow on the production and retention of secondary metabolites in saffron", Journal of agricultural and food chemistry, 53(15): p. 5969-5975, (2005).
[11] Maggi, L., Carmona, M., Zalacain, A., Tomé, M. M., Murcia, M. A., Alonso, G. L., "Parabens as agents for improving crocetin esters' shelf-life in aqueous saffron extracts", Molecules, 14(3), 1160-1170, (2009).
[12] Iborra, J. O. L., Castellar, M. R., Canovas, M. A., Manjon, A. R., "TLC preparative purification of picrocrocin, HTCC and crocin from saffron", Journal of Food Science, 57(3), 714-716, (1992).
[13] Abrishami, M. H., Jamalzadeh, M., "Understanding of Iranian Saffron", Tous, Tehran. pp.212-220, (1987).
[14] Melnyk, J. P., Wang, S., Marcone, M. F., "Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: saffron", Food Research International,. 43(8): p. 1981-1989, (2010).
[15] Kamalipour, M., Akhondzadeh, S., "Cardiovascular effects of saffron: An evidence-based review", The Journal of Tehran University Heart Center, 6(2): p. 59-61, (2011).
[16] Shahi, T., Assadpour, E., Jafari, S. M., "Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron", Trends in Food Science & Technology, 58: p. 69-78, (2016).
[17] Kafi, M., Rashed, M. H., Koocheki, A., "Saffron: Production technology and processing. Center of Excellence for Agronomy (Special Crops)", Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, 37: p. 53-57, (2002).
[18] Negbi, M., Saffron cultivation, in Saffron: Crocus sativus L., CRC Press. p. 1-17, (1999).
[19] Kafi, M., H., Koocheki, A., Rashed, M., "Saffron (Crocus sativus) production and processing", Vol. 8.: Science Publishers Enfield, NH., (2006).
[20] ISO3632-2, Organization for Standardization Technical Specification. Saffron (Crocus sativus L.) Part 2 test methods) Geneva, Switzerland: International, (2011).
[21] Orfanou, O., Tsimidou, M., "Evaluation of the colouring strength of saffron spice by UV—Vis spectrometry", Food chemistry,. 57(3): p. 463-469, (1996).
[22] Zareena, A., Variyar, V., Gholap, P. S., Bongirwar, A. S., "Chemical investigation of gamma-irradiated saffron (Crocus sativus L.)", Journal of agricultural and food chemistry, 49(2): p. 687-69, (2001).
[23] Sugiura, M., Shoyama, Y., Saito, H., Abe, K., "Crocin (crocetin di-gentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo", Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 271(2): p. 703-707, (1994).
[24] Pfister, S., Meyer, P., Steck, A., Pfander, H., "Isolation and structure elucidation of carotenoid− glycosyl esters in gardenia fruits (gardenia jasminoides ellis) and saffron (crocus sativus linne)", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(9): p. 2612-2615, (1996).
[25] Zarghami, N., Heinz, D., "Monoterpene aldehydes and isophorone-related compounds of saffron", Phytochemistry, 10(11): p. 2755-2761, (1971).
[26] Sarfarazi, M., Jafari, S. M., Rajabzadeh, G., "Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology", Food Analytical Methods, p. 1-13, (2015).
[27] Zhang, H., Zeng, Y., Yan, F., Chen, F., Zhang, X., Liu, M., Liu, W., "Semi-preparative isolation of crocins from saffron (Crocus sativus L.)", Chromatographia, 59(11-12): p. 691-696, (2004).
[28] Yang, B., Gao, Y., Liu, X., Li, Y., & Zhao, J., "Adsorption characteristics of crocin in the extract of gardenia fruits (Gardenia jasminoides Ellis) on macroporous resins", Journal of food process engineering, 32(1): p. 35-52, (2009).
[29] Yang, B., Liu, X., Gao, Y., "Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia (Gardenia jasminoides Ellis) fruits with response surface methodology", Innovative Food Science & Emerging Technologies, 4 (10), p. 610-615, (2009).
[30] Liang, Z., Yang, M., Xu, X., Xie, Z., Huang, J., Li, X., Yang, D., "Isolation and Purification of Geniposide, Crocin-1, and Geniposidic Acid from the Fruit of Gardenia jasminoides Ellis by High-Speed Counter-Current Chromatography", Separation Science and Technology,9 (49), p. 1427-1433, (2014).
[31] Tarantilis, P. A.., Polissiou, M. G., "Isolation and identification of the aroma components from saffron (Crocus sativus)", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(2): p. 459-462, (1997).
[32] Heydari, S., Haghayegh, G. H., "Extraction and microextraction techniques for the determination of compounds from saffron", Can Chem Trans, 2: p. 221-247, (2014).
[33] Kadkhodaee, R., Hemmati-Kakhki. A., "Ultrasonic extraction of active compounds from saffron", in II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739.(2006).
[34] Maggi, L., Sánchez, A. M., Carmona, M., Kanakis, C.

D., Anastasaki, E., Tarantilis, P. A., Alonso, G. L., "Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (Crocus sativus L.)", Food Chemistry, 127(1): p. 369-373, (2011).

[35] Kyriakoudi, A., Tsimidou, M. Z., "A food-grade approach to isolate crocetin from saffron (Crocus sativus L.) extracts", Food Analytical Methods, 8(9): p. 2261-2272, (2015).

[36] Ferrara, L., Naviglio, D., Gallo, M., "Extraction of Bioactive Compounds of Saffron (Crocus sativus L.) by Ultrasound Assisted Extraction (UAE) and by Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE)", European Scientific Journal, 10(3), (2014).

[37] Mokhtari, B., Pourabdollah, K., "Extraction of saffron ingredients and its fingerprinting by nano-emulsion membranes", Indian Journal of Chemical Technology, 20(3): p. 222-228, (2013).

[38] Ashraf-Khorassani, M., Combs, M. T., Taylor, L. T., "Supercritical fluid extraction of metal ions and metal chelates from different environments", Journal of Chromatography A, 774(1): p. 37-49, (1997).

[39] Lozano, P., Delgado, D., Gomez, D., Rubio, M., Iborra, J. L., "A non-destructive method to determine the safranal content of saffron (Crocus sativus L.) by supercritical carbon dioxide extraction combined with high-performance liquid chromatography and gas chromatography", Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 43(1): p. 367-378, (2000).

[40] Zougagh, M., Ríos, A., Valcárcel, M., "Determination of total safranal by in situ acid hydrolysis in supercritical fluid media: Application to the quality control of commercial saffron", Analytica chimica acta, 2: 578, p. 117-121, (2006).

[41] Nerome, H., Ito, M., Machmudah, S., Kanda, H., Goto, M., "Extraction of phytochemicals from saffron by supercritical carbon dioxide with water and methanol as entrainer", The Journal of Supercritical Fluids, 107: p. 377-383, (2016).

[42] Poole, C. F., "New trends in solid-phase extraction", Trac Trends in analytical chemistry", 22(6): p. 362-373, (2003).

[43] Hennion, M. -C., "Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography", Journal of chromatography A, 856(1): p. 3-54, (1999).

[44] Camel, V., "Extraction techniques", Analytical and bioanalytical chemistry, 372(1): p. 39-40, (2002).

[45] Visser, N., Lingeman, H., Irth, H., "Sample preparation for peptides and proteins in biological matrices prior to liquid chromatography and capillary zone electrophoresis", Analytical and bioanalytical chemistry, 382(3): p. 535-558, (2005).

[46] Schmerr, M. J., Cutlip, R. C., Jenny, A., "Capillary isoelectric focusing of the scrapie prion protein", Journal of Chromatography A, 802(1): p. 135-141, (1998).

[47] Naylor, S., Tomlinson, A. J., "Membrane preconcentration-capillary electrophoresis tandem mass spectrometry (mPC–CE–MS/MS) in the sequence analysis of biologically derived peptides", Talanta, 45(4): p. 603-612, (1998).

[48] Tomlinson, A. J., Benson, L. M., Jameson, S., Johnson, D. H., Naylor, S., "Utility of membrane preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry in overcoming limited sample loading for analysis of biologically derived drug metabolites, peptides, and proteins", Journal of the American Society for Mass Spectrometry, *8*(1), 15-24, (1997).

[49] Sánchez, A. M., Carmona, M., del Campo, C. P., Alonso, G. L., "Solid-phase extraction for picrocrocin determination in the quality control of saffron spice (Crocus sativus L.)", Food Chemistry, 116(3): p. 792-798, (2009).

[50] Chryssanthi, D. G., Lamari, F. N., Georgakopoulos, C. D., Cordopatis, P., "A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma—Application after saffron tea consumption", Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 55(3): p. 563-568, (2011).

[۵۱] بطحایی, س. ز.، اشرافی، م.، بولحسنی، ا.، اعتمادی کیا، ب.، موسوی موحدی، ع. ا.، "خالص سازی کاروتنوئیدها و منوترپن آلدئیدهای زعفران ایران و بررسی اثر هر یک بر ساختار DNA، هیستون H1 و کمپلکس H1-DNA"، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، دوره ۲۲، شماره ۲، ۸۵ تا ۹۷، (۱۳۸۵).

[52] Bolhasani, A, Bathaie, S. Z., Yavari, I., Moosavi, A. A., Ghaffarii, M., "Separation and Purification of Some Components of Iranian Saffron", Asian Journal of Chemistry, 17(2): p. 725-729, (2005).

[53] Mohajeri, S. A., Hosseinzadeh, H., Keyhanfar, F., Aghamohammadian, J., "Extraction of crocin from saffron (Crocus sativus) using molecularly imprinted polymer solid-phase extraction", Journal of separation science, 33(15): p. 2302-2309, (2010).

[54] Hadizadeh, F., Mohajeri, S., Seifi, M., "Extraction and purification of crocin from saffron stigmas employing a simple and efficient crystallization method", Pakistan Journal of Biological Sciences, 13(14): p. 691, (2010).

[55] Montalvo-Hernández, B., Rito-Palomares, M., Benavides, J., "Recovery of crocins from saffron stigmas (Crocus sativus) in aqueous two-phase systems", Journal of Chromatography A, 1236: p. 7-15, (2012).

[56] Kulkarni, S., Sane, A., Bhise, K., Patil, A., Dhamole, P., Desai, S., "Development of Extraction Methods and Quantification of Safranal by High Performance Liquid Chromatography from Cuminum cyminum L. and Studying its Antimicrobial Properties", in International Congress on Environmental, Biotechnology, and Chemistry Engineering, vol. 64, (2014).