Archive of SID

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵ ص. ۳۰۰-۲۹۱

Saffron Agronomy & Technology
Vol. 4, No. 4, Winter 2016, P. 291-299
DOI: 10.22048/jsat.2016.38670

شناسایی ایزومرهای آپوکاروتنوئید کروسین و کروستین موجود در عصاره خام زعفران (*Crocus sativus*) از طریق کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنجی‌جرمی

نورالدین حسین پورآزاد[۱*]، قربانعلی نعمت زاده[۲]، جووانی جولیانو[۳]، غلامعلی رنجبر[۲] و احد یامچی[٤]

تاریخ دریافت: ۲۷ اسفند ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: ۳ خرداد ۱۳۹۵

چکیده

از مهمترین متابولیت‌ها در زعفران آپوکاروتنوئیدهای کروستین و کروسین می‌باشند. رنگ زعفران بطور عمده به میزان و کیفیت حضور ماده کروسین بستگی دارد که خود فرم استری گلیکوزیله شده ماده کروستین توسط آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز می‌باشد. در این مطالعه به جداسازی و شناسایی این متابولیت‌ها در عصاره متانولی و کلرفرمی کلاله زعفران در مرحله گرده افشانی با دستگاه کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنجی جرمی (LC-APCI-MS) پرداخته شده است. شناسایی ایزومرهای سیس و ترانس آپوکاروتنوئیدهای کروسین و کروستین بر اساس سه مؤلفه طیف جرمی این ترکیبات در فاز یون منفی، زمان بازداری و دامنه جذبی آنها صورت پذیرفت. تغییر این پارامترها در شناسایی ایزومرهای کروسین بر اساس موقعیت اتصال واحدهای UDP–گلوگز و جنتیوبیوزیل به آپوکاروتنوئید کروستین و هم چنین تعداد این واحدهای اتصال یافته به این ترکیب امکان شناسایی فرم‌های مختلف کروسین را میسر می سازد. از تعداد ۹ ترکیب شناسایی شده دو ترکیب مربوط به متابولیت‌های پیکروکروسین و کروستین و بقیه به عنوان ایزومرهای سیس و ترانس کروسین ها شناسایی شدند. فرم‌های مختلف شناسایی شده کروسین‌ها که از جمله ترکیبات مهم قطبی گروه متابولیت‌های کاروتنوئیدی در کلاله زعفران می‌باشند به فرم استرهای کروستین –گلوکز (بتا دی گلوکوپیرانوزیل) و جنتیوبیوز (بتا دی گلوکوپیرانوزیل دی گلوکز) شناسایی گردیدند. همچنین یونهای شارژ مضاعف با توجه به تقارن بالای مولکولی تنها برای ایزومر ترانس کروسین-۴ مشاهده گردید. دستگاه کروماتوگرافی استفاده شده در این تحقیق ابزاری قدرتمند برای بررسی ترکیبات موجود در منابع گیاهی هم چون زعفران بوده که استفاده از روش APCI-MS در فاز یون منفی امکان تفکیک و شناسایی دقیق انواع مختلف فرم‌های استری ایزومرهای کروسین را عمدتاً بر پایه تشخیص یون‌های مرتبط با قطعات حاصل از کاهش واحدهای گلوکوزیل یا جنتیوبیوزیل و هم چنین قطعات حاصل از شکست‌های مولکولی، امکانپذیر می سازد.

کلمات کلیدی: زعفران، طیف سنجی جرمی، کروستین، کروسین، متابولیت.

۱- استادیار گروه اصلاح نباتات، مهندسی ژنتیک، دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی.
۲- استاد گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی، آژانس ملی تکنولوژی‌های نو ایتالیا (ENEA).
۴- استادیار ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
(*- نویسنده مسئول: Gmplant21@gmail.com)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) یک گیاه نر عقیم و چند ساله از خانواده ایریدیاسه (Iridaceae) بوده که کشت زراعی نوع تریپلوئید (2n = 3x = 24) آن درکمربند آب و هوایی معتدل از اسپانیا تا کشمیر گسترش یافته است. هرچند، محل دقیق اهلی شدن این گیاه کاملاً مشخص نمی‌باشد اما بررسی های باستان‌شناسی نقاشی‌های دیواری Minoan آن را به ۱۷۰۰-۱۵۰۰ سال قبل از میلاد ربط می‌دهند. کلاله خشک شده زعفران به عنوان گران‌ترین ادویه با قیمت هر کیلو ۷۰۰۰-۲۰۰۰ دلار در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد، قیمت بالای آن به دلیل هزینه برداشت آن بوده بطوریکه با در نظر داشتن وزن ۲ میلی گرم برای کلاله هر بوته زعفران، یک کیلوگرم ازکلاله زعفران حدودا ۱۱۰۰۰۰ تا ۱۷۰۰۰۰ بوته را شامل خواهد شد (Fernandez et al., 2004). طبق آمار ارائه شده از طرف انجمن زعفران ایران هم اکنون بیش از ۹۵ درصد بازار جهانی زعفران از ایران تأمین می‌شود. تولید زعفران در جهان در حدود ۲۷۰ تا ۲۸۰ تن است که ایران با حدود ۲۲۰ تا ۲۳۰ تن تولید در رتبه اول جهانی قرار دارد و پس از آن یونان با هفت تن، مراکش با سه تن، اسپانیا با یک تن و ایتالیا کمتر از یک تن در رتبه‌های بعدی قرار دارند. زعفران حاوی بیش از ۱۵۰ مواد فرار و خوشبو می‌باشد. همچنین دارای تعدادی مواد فعال و غیرفعال از ترکیبات کارتنوئیدی شامل زآگزانتین، لیکوپن و انواع مختلف آلفا و بتا کاروتن‌ها بوده و ثابت شده این گیاه منبع غنی از محتویات فنولیکی با فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد (Goli et al., 2012). کلاله‌های زعفران حاوی مقادیر زیادی (بالای ۸ درصد از وزن خشک) از آپوکارتنوئید کروستین و کروسین‌ها (فرم‌های گلیکوزیله شده کروستین) است. کروسین‌ها مسئول رنگ قرمز کلاله، پیکروکروسین مسئول طعم تلخ و سافرانال مسئول عطر تند زعفران می‌باشند (Caballero et al., 2007).

آپوکارتنوئیدها بطور متابولیکی مشتق شده از شکست اکسیداتیوی کارتنوئیدهای C40 می‌باشند. به چند دلیل مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدها مورد توجه مهندسان متابولیت است. یکی این که کاروتنوئیدها ترکیبات رنگی مهمی در گل‌ها، غذاها و میوه‌ها هستند و دیگر اینکه خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. متابولیسم آپوکارتنوئیدها در گل‌های زعفران بویژه در در کروموپلاست‌های کلاله اتفاق می افتد. ولی در دیگر گیاهان، این عمل در کلروپلاست‌ها رخ می‌دهد. در کلاله زعفران، مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات فرار و غیر فرار که نقش عمده‌ای در تعیین عطر و طعم دارند وجود دارد (Gomez et al., 2010). اکثر ترکیبات زعفران شامل آپوکارتنوئیدهای سیس و ترانس کروسین‌ها، پیکروکروسین (بتا دی گلو کوپیرانوزید- هیدروکسیل- بتا- سیکلوسیترال) و فراوردهای تخریبی آن هم چون سافرانال می باشند (Kanakis et al., 2004). هر چند در مطالعات اخیر ترکیبات مختلفی از مواد فرار در بافت‌های کلاله شناسایی شده است (Rubio et al., 2008). ولی احتمال داده می‌شود، فرایندهای تخریبی صورت گرفته بر روی آپوکارتنوئیدها مسئول ویژگی‌های حسی (عطر و بو) زعفران می‌باشد (Dauria et al., 2006). اخیرا، روش‌های کروماتوگرافی هم‌چون کروماتوگرافی لایه نازک (Jin et al., 1986) و کروماتوگرافی گازی (Casas et al., 2005; Carmona et al., 2006) به عنوان کارآمدترین روش برای تجزیه و تحلیل ترکیبات زعفران توصیه می‌شود. اما جهت کمیت سنجی کروسین‌ها و اندازه‌گیری پیکروکروسین، سافرانال HTCC و کامفرول دی‌گلوسید در نمونه‌های مختلف زعفران از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC[1]) مجهز به آشکار ساز نوری (Vis) و فلورسانس (UV) بکار گرفته می‌شود (Caballero et al., 2007; Lozano et al., 1999). در این تحقیق علاوه بر یون‌های مربوط به شبه

1- High performance liquid chromatography

www.SID.ir

Archive of SID

مولکول‌ها، یون‌های قطعات مولکولی دیگری نیز شناسایی گردیدند که کمک مؤثری در شناخت دقیق یون‌های مرتبط با ترکیبات موجود در عصاره زعفران نمود. تاکنون مطالعاتی مبنی بر شناسایی آپوکاروتنوئیدهای موجود در کلاله زعفران با استفاده از پروب‌های مختص یونیزاسیون شیمیایی (APCI) انجام نپذیرفته است لذا هدف از انجام این تحقیق شناسایی کیفی فرم های مختلف از ایزومرهای سیس و ترانس آپوکاروتنوئید کروستین و کروسین موجود در عصاره خام کلاله زعفران با استفاده از کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنجی جرمی (LC-APCI-MS[1]) در فاز یونی منفی بود.

مواد و روش ها

نمونه‌های کلاله خشک شده زعفران از دانشکده داروسازی دانشگاه کاستلا لامانچا اسپانیا تهیه شده و آزمایش حاضر در بخش بیوتکنولوژی گیاهی آژانس ملی تکنولوژی‌های ایتالیا (ENEA) انجام پذیرفت. مقدار ۵۰ میلی گرم از کلاله خشک شده زعفران پودر گردیده و سپس جهت استخراج متابولیت‌های قطبی هم‌چون ایزومرهای کروسین، مقدار ۱ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد به هر یک از نمونه‌ها اضافه شده و سونیک گردیدند. به سوسپانسیون حاصله جهت استخراج متابولیت‌های غیر قطبی مقدار یک میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شده و پس از ورتکس شدید به مدت ۲۰ دقیقه در حداکثر سرعت سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی همان فاز متانولی بوده که حاوی متابولیت‌های قطبی بوده و فاز پایینی یا فاز کلروفرمی حاوی متابولیت‌های غیرقطبی می‌باشند. پس از جداسازی فازهای قطبی و غیرقطبی، هر کدام از آنها در شرایط خلع خشک شدند. فاز غیرقطبی خشک شده (حاوی متابولیت‌های غیرقطبی) در ۲ میلی‌لیتر استات اتیل حاوی استاندارد داخلی آلفا توکفرول دی استات با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل گردید. همچنین فاز قطبی خشک شده (حاوی متابولیتهای قطبی) در ۲ میلی‌لیتر محلول متانول ۵۰ درصد که حاوی استاندارد داخلی یک میکروگرم در میلی‌لیتر از ماده فورمانونتین بود بطور کامل حل شد. پس از سانتریفیوژ جداگانه محلول‌های حاوی متابولیت‌های قطبی و غیرقطبی، از فاز مایع آنها به مقدار ۱۰ میکرولیتر در سه تکرار جهت ارزیابی و آنالیز متابولیت‌های کارتنوئیدی و آپوکاروتنوئیدی در دستگاه کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف‌سنج جرمی (LTQ-Orbitrap MassSpectrometry) شرکت ترموفیشر (Thermo Fisher Scientific)، تزریق شدند، تمامی محلول-های استفاده شده با درجه کیفی LC-MS (CHROMASOLV® Sigma-Aldrich) بوده که از شرکت سیگما تهیه گردیدند. جهت تعیین زمان بازداری[2] مرتبط با هر یک از متابولیت‌ها، جداسازی آپوکاروتنوئیدها در عصاره خام زعفران با استفاده از ستون فاز معکوس C30 (3.0 mm x 100) (YMCEurope GmbH)، در فازهای متحرک مایع شامل متانول خالص (A)، متانول و آب به نسبت ۸۰:۲۰ به همراه 0.2٪ استات آمونیوم (B) و ترت- متیل بوتیل اتر (C) با گرادیانت‌های ترکیبی 95%A:5%B به مدت ۱/۳ دقیقه و به دنبال آن 80%A:5%B:15%C بمدت ۲ دقیقه و در نهایت با گرادیانت خطی در فاز ترکیبی 30%A:5%B:65%C به مدت ۱۳/۲ دقیقه، انجام گردیده و شناسایی طیف های جذبی UV-Vis در دامنه ۲۲۰–۷۰۰ نانومتر با آشکارساز آرایه فتودیود (PDA, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) انجام پذیرفت. همچنین یونیزاسیون APCI-MS در فاز یونی منفی در بازه زمانی (۶–۱۸ دقیقه) با بکارگیری گاز نیتروژن در گرادیانت دمایی ۳۰۰ و ۲۵۰ درجه سانتیگراد و تنظیم جریان با ولتاژ ثابت صفر و ۹۵ ولت به ترتیب برای ستون کاپیلاری و

1– Liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry

2– Retention time

www.SID.ir

Archive of SID

محفظه یونیزاسیون صورت گرفته و شناسایی جرم دقیق یونهای مرتبط با هر یک از آنالیت ها بر پایه نسبت جرم به بار (m/z[1]) و طبق روش بکار گرفته شده توسط فانتینی و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد (Fantini et al., 2013). در نهایت جهت آنالیز هر یک از پیک‌های مرتبط با متابولیت‌ها در کروماتوگرام‌های حاصله، از نرم افزار Thermo Scientific™ Xcalibur™ استفاده گردید.

نتایج و بحث

عمده ترکیبات شناسایی شده در این تحقیق در عصاره خام زعفران مربوط به فرم‌های مختلف کروسین‌ها بوده که از جمله ترکیبات قطبی گروه متابولیت‌های کاروتنوئیدی بوده و می‌توانند به فرم استرهای کروسین -گلوکز (بتا دی گلوکوپیرانوزیل) و جنتیوبیوز (بتا دی گلوکوپیرانوزیل دی گلوکز) وجود داشته باشند

۱

جدول۱- پیک‌های جداسازی شده با روش APCI-MS در فاز یونی منفی مرتبط با ایزومرهای کروسین و کروستین در شکل b۱

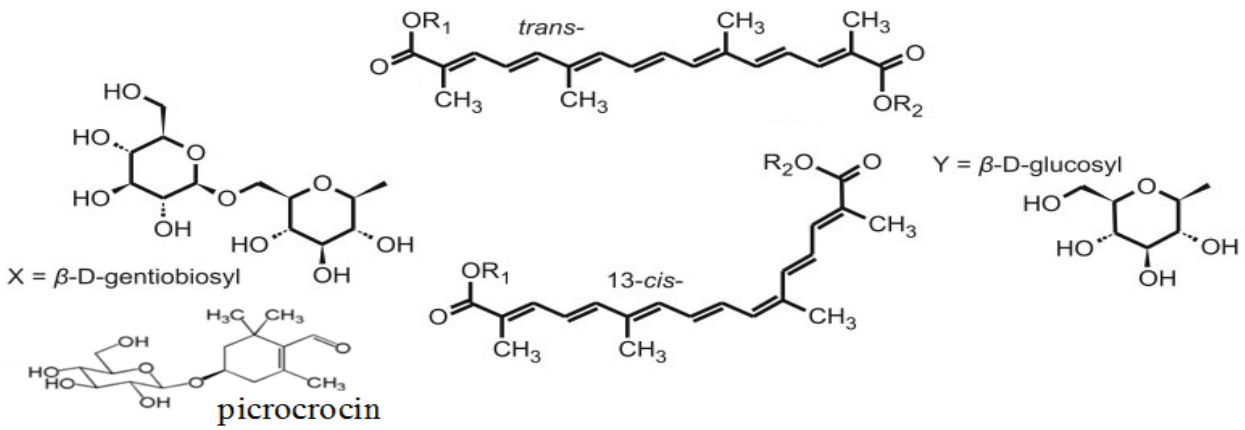
Table1- Compounds separated as peaks related to Crocin and Crocetin isomers that shown in Figure 1 b by APCI –MS detection in negative ion mode

شماره پیک Pick Number	ایزومرهای کروسین و کروستین Crocin and Crocetin isomers	فرم گلیکوزیله شده کروستین Crocetin glycosylated form	زمان بازداری Retention time	طول موج جذبی Absorption wavelength	جرم مولکولی مونو ایزوتوپیک Mono isotopic molecular mass	یونهای مرتبط با قطعات مولکولی Molecular fragments ion's
1	پیکروکروسین Picro crocin	-	8.25	249	-	-
2	ترانس کروسین-۴ Trans crocin-4	دی (بتا-دی-جنتیوبیوزیل) D- (β-D-Gentiobiosyl)	10.43	442	975.4 $[M-H]^-$, 487.2 $[M-2H]^{2-}$	651.2 $[M-H-Gnt]^-$
3	ترانس کروسین-۳ Trans crocin-3	بتا-دی-جنتیوبیوزیل-بتا-دی-گلوکوزیل β-D-Glucopyranosyl-β-D- Glucosyl	11.3	441	813.3 $[M- H]^-$	651.2 $[M-H-Glc]^-$, 489.2 $[M-H-Gnt]^-$
4	ترانس کروسین-۲' Trans crocin-2'	دی (بتا-دی- گلوکوزیل) D- (β-D-Glucosyl)	12.58	435	نامعلوم Unknown	489.2 $[M-H-Glc]^-$
5	ترانس کروسین- ۲ Trans crocin-2	بتا-دی-جنتیوبیوزیل β-D-Gentiobiosyl	14	435	651.2 $[M-H]^-$	نامعلوم Unknown
6	سیس کروسین- ۴ Cis crocin-4	-	13.81	435	975.4 $[M-H]^-$	651.2 $[M-H-Gnt]^-$
7	سیس کروسین-۳ Cis crocin-4	-	14.81	435	813.3 $[M-H]^-$	651.2 $[M-H-Glc]^-$
8	ترانس کروسین- ۱ Trans crocin-1	بتا-دی-گلوکوزیل β-D-Glucosyl)	15.56	435	489.2 $[M-H]^-$	327.2 $[M-H-Glc]^-$
9	کروستین Crocetin	-	19.8	443	328.41$[M-H]^-$	-

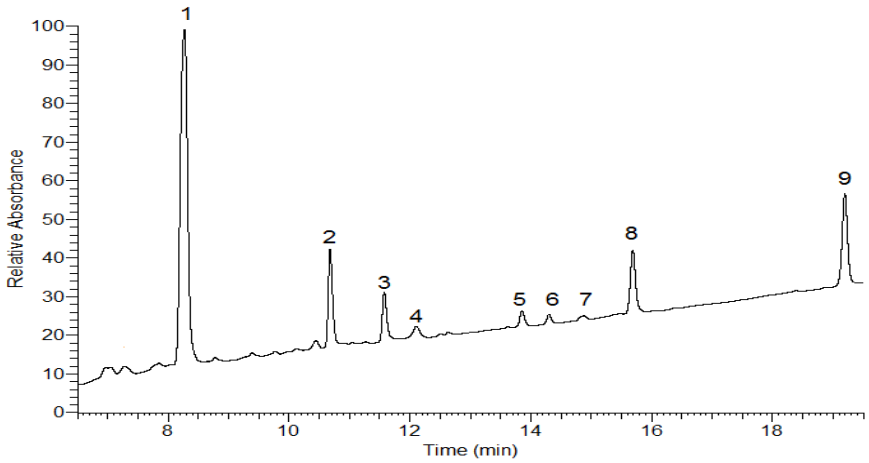
1- Mass-to-charge ratio

www.SID.ir

Archive of SID



1a



1b

شکل ۱ آ- ساختارها و جرم مولکولی مونو ایزوتوپ‌های مرتبط با ایزوفرم‌های مختلف کروسین‌ها و کروستین در عصاره زعفران (کروسین-٤ (R1=R2=X)، کروسین-۳ (R1=X, R2=Y)، کروسین-۲' (R1=R2=Y)، کروسین-۲ (R1=Y, R2=H)، کروسین-۱ (R1=Y, R2=H)، کروستین (R1=R2=H)). ۱b: کروماتوگرام حاصل از جداسازی ایزومرهای مختلف آپوکارتنوئیدهای کروسین و کروستین در عصاره زعفران با روش تشخیص PDA در فاز یونی منفی (در جدول ۱ اسامی پیک‌ها آورده شده است).

Figure 1a- Sturucters and mono isotopic molecular mass correspond to different isoformes of Crocines and Crocetines in Saffron crude extracte; Crocin-4 (R1=R2=X), Crocin-3 (R1=X, R2=Y), Crocin- 2'(R1=R2=Y), Crocin- 2 (R1=Y, R2=H), Crocin- 1 (R1=Y, R2=H), Crocetin (R1=R2=H). 1b: PDA obtained chromatograms in negative ion's mode related to different isomers of Crocetin and Crocin in saffron crude extract. (The name of each picks has shown in table1).

کروماتوگرام‌های حاصله با روش اسپکتروفتومتری و طیف سنجی جرمی در فاز یونی منفی با دستگاه LC-APCI-MS در عصاره خام زعفران که عمدتاً ایزومرهای مرتبط با کروسین‌ها می‌باشند در شکل۱ و جدول ۱ آورده شده‌اند.

همانطور که در جدول۱ مشاهده می‌شود از آنالیز کروماتوگرام‌های حاصله از عصاره خام زعفران تعداد ۹ نوع ترکیب آپوکاروتنوئیدی شامل دو ترکیب کروستین و پیکروکروسین و تعداد ۷ نوع ترکیب از فرم‌های مختلف سیس و ترانس آپوکاروتنوئید کروسین جداسازی و شناسایی گردید.

در ساختمان مولکولی کروسین-۴ که از جمله متابولیت‌های شناسایی شده بود که هر دو گروه کربوکسیلیک انتهایی با جنتیوبیوز استریفه شده‌اند. در کروسین-۳ می‌توان ساختار گلوکوزیل- جنتیوبیوزیل[1](Glc-Gnt) الحاق شده به آپوکاروتنوئید کروستین را مشاهده نمود. کروسین-۲' و کروسین-۲، با وجود داشتن جرم مولکولی یکسان ساختار

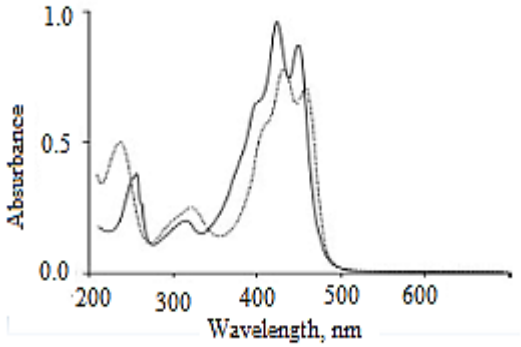
1- Gentiobiosyl- Glucose

www.SID.ir

Archive of SID

متفاوتی را نشان می‌دهند. کروسین-'۲ از مشتقات جنتیبیوزیل کروستین و کروسین-۲ حاوی دو مولکول گلوکوزیل در ساختار خود بوده و کروسین-۱ مولکول استریفه شده با یک گلوکز می-باشد (شکل۱).

در این تحقیق، استفاده از طیف سنجی جرمی APCI-MS امکان شناسایی اکثر ایزومرهای کروسین‌ها و کروستین‌ها را فراهم ساخت. همچنین در فاز یونی منفی تعدادی ترکیبات نامعلوم در الکتروگرام‌های حاصله از عصاره خام مشخص بودند که احتمالاً یون‌های مرتبط با ترکیبات اضافی هم‌چون سدیم، پتاسیم و آمونیوم و هم چنین قطعات یونی حاصل از واحدهای گلیکوزید می‌باشند. ایزومرهای کروسین‌ها بر اساس موقعیت اتصال UDP-گلوگز و جنتیوبیوزیل به آپوکارتنوئید کروستین و هم چنین تعداد واحدهای اتصال یافته با توجه به جرم مولکولی مرتبط با خود شناسایی شدند. کروسین -۴، دی (بتا- دی-جنتیوبیوزیل) استر کروستین به شکل‌های سیس و ترانس در محتویات عصاره تشخیص داده‌شد (پیک ۶ جدول ۱). طیف-جرمی برای هر دو شکل سیس و ترانس، یون‌های شبه مولکولی $[M-H]^-$ در محدوده جرم مولکولی ۹۵۷,۴ ثبت گردید در صورتیکه ایزومر ترانس شارژ شده یونی مضاعف $[M-2H]^{2-}$ در محدود جرم مولکولی ۴۸۷,۲ مشاهده گردید. هم چنین حذف یک واحد جنتیوبیوزیل $[M-H-Gnt]^-$ منجر به ایجاد سیگنالی در محدوده جرم مولکولی ۶۵۱,۲ شد. علاوه بر سیگنال‌های شناسایی شده تعداد زیادی سیگنال نامعلوم در نتایج حاصله از طیف سنجی قابل مشاهده بودند آنالیز دقیق داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد وجود سیگنال‌هایی با جرم مولکولی بالا دلالت بر یون‌های ترکیبات اضافی حاصله از مولکول‌های تغییر دهنده حاضر در فاز متحرک دارند. برای سایر متابولیت‌ها تشخیص ماهیت مولکولی متابولیت‌ها بر اساس زمان بازداری، دامنه جذب اسپکتروفوتومتری (UV-Vis) و هم چنین طیف جرمی حاصله صورت پذیرفت. بطور کلی محدوده جذبی ثبت شده در این پروژه برای کاروتنوئیدهای مهم بطور عمده دو پیک مضاعف بین طیف نوری ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر و دو پیک اضافی در محدوده فرابنفش می‌باشد. طیف ثبت شده برای ترانس کروستین حداکثر جذب را در طول موج‌های ۲۵۶، ۳۱۵، ۴۲۳ و ۴۴۹ نانومتر نشان می‌دهد و در ترانس کروسین-۴ (استر دی جنتیوبیوزیل) طیف جذبی به ترتیب در طول موج‌های ۲۳۵، ۳۲۴، ۴۳۲ و ۴۵۷ نانومترثبت گردید (شکل۲).



شکل ۲- پیک‌های مرتبط با طیف جذبی اسپکتروفتومتری ترانس کروستین (خط ممتد) و ترانس کروسین (خط غیر ممتد)

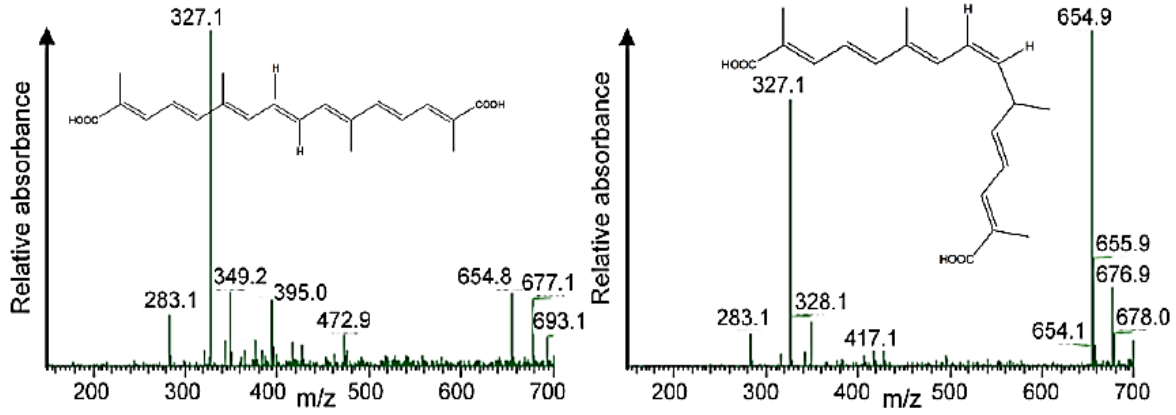
Figure 2- UV–Vis spectra correspond to *trans*-crocetin (continuous line) and *trans*-crocin (dotted line).

بررسی طیف سنجی جرمی ترانس کروستین و سیس کروستین در فاز یونی منفی با استفاده از HPLC-APCI-MS، نشان از دقت و حساسیت این روش در تفکیک و شناسایی فرمهای مختلف کروستین (سیس- ترانس) داشت با اینکه ترانس کروستین و سیس کروستین دارای جرم مولکولی یکسان می‌باشند قطعات حاصله از یونیزاسیون فرم‌های استری کروستین فراوانی کاملاً متفاوتی نشان می‌دهند. همانطور که در شکل ۳ قابل مشاهده است یونیزاسیون حاصل از قطعات مرتبط با فرم استری ترانس کروستین که فراوانی بیشتری نسبت به فرم استری سیس کروستین در محدود (m/z) ۶۵۴ نشان می‌دهد که نشان از وجود یون‌های شارز مضاعف $[M-2H]^2$ برای فرم

www.SID.ir

Archive of SID

ترانس کروستین می‌باشد (شکل۳). کارمونا و همکاران (Carmona et al., 2006) در تحقیقی مشابه با استفاده از HPLC-ESI-MS به بررسی استرهای کروستین و پیکروکروستین در گیاه زعفران پرداخته و تعداد ۱۵ نوع از فرم-های مختلف استری کروستین را شناسایی نمودند که تفاوت هر یک از این فرم‌های استری در نوع و موقعیت مولکول‌های الحاق شده هم‌چون فرم استری ترانس و سیس کروستین (بتا–دی تری گلوکوزید) – (بتا– دی– جنتیوبیوزیل)، فرم استری ایزومرهای سیس و ترانس کروستین (بتا –دی نئاپولیتانوز) – (بتا– دی گلوکوزیل) و فرم استری ایزومر سیس کروستین (بتا – دی نئاپولیتانوز) – (بتا– دی جنتیوبیوزیل) به ترکیب اصلی کروستین بود که منجر به ایجاد فرم‌های متنوع استری شد. نتایج حاصل از این تحقیق در داشتن فرم‌های استری حاصله از ترکیب نئاپولیتانوز متفاوت و در فرم‌های دارای گلوکوزیل و جنتیوبیوزیل مشابه با نتایج کارمونا و همکاران (Carmona et al., 2006) بود که دلیل آن احتمالاً استفاده از پروتکل‌ها و پروب‌های متفاوت در شناسایی ترکیبات مورد نظر می‌باشد.



شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از جداسازی و شناسایی ایزومرهای سیس و ترانس کروستین در فاز یونی منفی به همراه ساختار مولکولی آن
Figure 3- Molecular structures and chromatograms peaks corresponds to separated and identified isomers of Crocin and Crocetin in negative ion's mod.

در مقایسه با تشخیص‌های نوری و فلورسانس، استفاده از طیف سنجی جرمی (ESI-MS[1]) و (APCI-MS[2]) در شناسایی متابولیت‌ها با حساسیت و اختصاصیت بیشتری همراه می‌باشد. در تحقیقی از دستگاه HPLC تجهیز شده با آشکارسازهای UV-Vis و طیف سنج جرمی (ESI-MS) در حالت یون مثبت برای بررسی دقیق عصاره زعفران خام بکار گرفته‌شد و مطابق با نتایج حاصله از این تحقیق، عمده ترکیبات شناسایی شده در مرحله گرده افشانی آپوکاروتنوئیدهای گروه کروسین بوده که تایید کننده خوبی برای نتایج این پروژه در استفاده از روش APCI-MS می‌باشد (Tarantilis et al., 1995). اورتگا و همکاران (Caballero-Ortegaet al., 2007) به ارزیابی مواد متابولیتی فعال در یازده نمونه از زعفران جمع‌آوری شده از مناطق آذربایجان، چین، یونان، فرانسه، هندوستان، ایران، ایتالیا، نیوزیلند، اسپانیا و ترکیه را در مقایسه با ترکیبات متابولیتی خالص تهیه از شرکت سیگما را با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به فتودیود پرداخته و تعداد ۱۰ ترکیب

1 –Electrospray ionization mass spectrometry
2 –Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry

www.SID.ir

Archive of SID

مهم از جمله پیکروکروسین، ۳- جنتیوبیوزیل- کامپفرول و انواع کروسین‌ها را در محدوه سه طول موج مختلف شناسایی نمودند نتایج حاصل از تحقیقات آنان نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده برخی از مناطق همچون اسپانیا دارای مقادیر بیش از ۸ درصد از کارتنوئیدهای گلیکوزیدی محلول در آب هم‌چون کروسین‌ها می‌باشند که با نتایج حاصله از تحقیق حاضر با توجه به اینکه نمونه‌های استفاده شده از گونه‌های رویش یافته زعفران در اسپانیا بود، نشان داد که محتویات متابولیتی موجود در عصاره خام زعفران عمدتاً جزء متابولیت-های قطبی هم چون فرم‌های مختلف از ایزومرهای کروسین‌ها هستند که تأیید کننده نتایج حاصله از این تحقیق می‌باشد (Caballero et al., 2007). در تحقیقی دیگر اسماعیلیان و همکاران در سال ۲۰۱۲ ترکیبات مختلف در محتویات کلاله زعفران را در طی زمان‌های مختلف برداشت مورد بررسی قرار دادند. مهمترین ترکیبات شناسایی شده در مرحله گرده افشانی سافرانال، پیکروکروسین، کروسین و کروستین بودند اما بر خلاف نتایج حاصل از تحقیق حاضر قادر به تفکیک ایزومرهای این متابولیت‌ها نبودند که نشان دهنده کارایی بهتر روش استفاده شده در این تحقیق می‌باشد همچنین ترکیبات دیگر شناسایی شده در تحقیق آنان شامل، 1 و 8- سینئول، آلفا پینن، اولئوآنولیک اسید، کائمپ فرول، 3- جنتیوبیوزیل کامپفرول، سینئول و اکینوسیتیک اسید بودند که در مجموعه متابولیت‌های شناسایی شده در پروژه ما وجود نداشتند دلیل این امر احتمالاً تفاوت در مرحله نمونه‌گیری باشد که زمان‌های مختلف برداشت تأثیر معنی‌داری در میزان و نوع متابولیت‌های زعفران دارد (Esmaeilian et al., 2012). از نتایج حاصل از تحقیق انجام یافته می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنج جرمی با وضوح بالا (LC-APCI-MS) ابزاری قدرتمند برای بررسی ترکیبات موجود در منابع گیاهی همچون زعفران بوده که روش APCI-MS در فاز یون منفی عمدتاً بر پایه تشخیص یون‌های مرتبط با قطعات حاصل از کاهش واحدهای گلوکوزیل یا جنتیوبیوزیل و همچنین شبه مولکول‌های کروسین‌ها منجر به شناسایی اکثر ایزومرهای کروسین (ایزومرهای سیس و ترانس) در این فاز می‌گردد. از جمله موارد دیگر اثبات کننده کارایی روش بکار گرفته شده در این پروژه امکان شناسایی یون‌های شارژ مضاعف بود که با توجه به تقارن بالای ساختار مولکولی برای ایزومر ترانس کروسین-۴ مشاهده گردید. با توجه به اینکه شناسایی فرم های مختلف مولکولی متابولیت‌های بیوسنتزی، از جمله موارد اولیه و اساسی در شناخت دقیق مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های گیاهی هم چون کروسین‌ها (رنگ اصلی زعفران) می‌باشند نتایج حاصل از این پروژه می‌تواند به‌عنوان نقشه راهی دقیق در تعیین استراتژی های به‌زراعی و به‌نژادی در بهبود صفات کیفی و کمی مانند رنگ و عطر در گیاه زعفران باشد. علاوه بر این یافته‌های حاصل از این پروژه به عنوان داده‌های با ارزش شیموتاکسنومیکی بوده که می‌توانند به عنوان ابزار بیوشیمیایی مؤثر در شناخت گونه‌ها و ارقام مختلف از گیاه زعفران کمک مؤثری نماید. هم‌چنین آگاهی از پروفیل ایزومرهای مختلف مولکولی مواد بیوسنتزی، در بحث مهندسی ژنتیک کمک مؤثری به شناخت آنزیمی مسیرهای بیوسنتزی مواد مؤثره گیاهی نموده که شناخت هر یک از ایزومرهای ژنی کد کننده این آنزیم‌ها نه تنها می‌تواند به عنوان نشانگر ژنی مؤثر در اصلاح و گزینش لاین‌های با ارزش در سطوح تحقیقات مزرعه‌ای باشد بلکه امکان بیان هترولوگ و تولید هریک از این متابولیت‌های با ارزش را بطور مجزا و خالص در میکروارگانیزم-های پروکاریوتی و یوکاریوتی فراهم می‌نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزای

این پروژه در آژانس ملی تکنولـوزی‌هـای نـو (ENEA) در شهر رم ایتالیا انجام شده و تمامی هزینه‌های انجام آن از طرف این مرکز تأمین گردید که بدین وسیله نهایت تشکر و قـدردانی را داریم.

منابع

Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R., and Abdullaev, F.I. 2007. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. Food Chemistry 100 (3): 1126–1131.

Carmona, M., Zalacain, A., Saa N., A.M., Novella, J.L., and Alonso, G.L. 2006. Crocetin esters, Picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and gardenia jasminoides fruits. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC-ESI-MS. Journal of Agricultural Food Chemistry 54: 973-979.

Casas-Catal´an, M.T., and Dom´enech-Carb´, O. 2005. Identificationofnatural dyes used in works of art by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry combined with in situ trimethylsilylation. Analytical and Bioanalytical Chemistry 382: 259-268.

Dauria, M., Mauriello, G., Racioppi, R., and Rana, G.L. 2006. Use of SPME-GC–MS in the study of time evolution of the constituents of saffron aroma, modifications of the composition during storage. Journal of Chromatographic Science 44: 18–21.

Esmaeilian, Y., Galavi, M., Ramroudi, M., and Boojar, M.M.A. 2012. Diurnal variability of stigma compounds of saffron (*Crocus sativus* L.) at different harvest times. Annals of Biological Research journal 3 (3):1562-1568.

Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., and Giuliano G. 2013. Dissection of tomato Lycopene biosynthesis through virus-Induced gene silencing. Plant Physiology 163: 986-998.

Fernandez, J.A., and Pandalai, S.G. 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Research Developement Plant Science 2: 127–159.

Goli, S.A.H., Mokhtari, F., and Rahimmalek, M. 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal. Journal of Agricultural Science 4 (10).

Gomez-Gomez, L., Moraga, A.R., and Ahrazen, O. 2010. Understanding carotenoid metabolism in saffron stigmas, Unraveling aroma and color formation. Functional Plant Science 4: 56-63.

Kanakis, C.D., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., and Polissiou, M.G. 2004. Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-hydroxy-2, 6, 6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron, Journal of Agricultural Food Chemistry 52: 4515–4521.

Tarantilis, P.A., Tsoupras, G., and Polissiou, M. 1995. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using highperformance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. Journal of Chromatography 699: 107-117.

Lozano, P., Castellar, M.R., Simancas, M.J., and Iborra, J.L. 1999. A quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. Journal of Chromatography 830: 477-483.

Jin, R.L., Qiao, Z.P., Zhou, S.D., Ye, Y.L., and Zhou, J.X. 1986. Investigation of saffron preparations by thin layer chromatography. Journal of Nanjing College of Pharmacy 17:

www.SID.ir

Archive of SID

247.

Rubio, A., Rambla, J.L., Santoella, M., Gomez, M.D., Orzaez, D., Granell, A., and Gomez-Gomez, L. 2008. Cytosolic and plastoglobule targeted caroteniod dioxygenase from *Crocus sativus* are both involved in β-ionone release. Journal of Biology Chemistry 283: 24816-24825.

www.SID.ir

Archive of SID

Identification of Apo- Carotenoids' Crocin and Crocetin Isomers in Saffron Crude Extracts by HPLC Coupled to Atmospheric Pressure Chemical Ionization and High Resolution Orbitrap Mass Spectrometry

Noraddin Hosseinpour azad[1], Ghorban Ali Nematzadeh[2], Govani Gouliano[3], Gholam Ali Ranjbar[3] and Ahad Yamchi[4]*

Received: 17 March, 2016 Accepted: 23 May, 2016

DOI: 10.22048/jsat.2016.38670

Abstract

The main metabolites in saffron are the Apo- carotenoids' Crocin and Crocetin. Color intensity and quality of saffron mostly depend on the presence of Crocins that are glycosylated steric form of Crocetin by glycosyltransferase enzyme. The aim of this study is the characterization of these metabolites in methanolic and chloroformic extracts of saffron stigmas during anthesis stage by LC-APCI-MS. Identification of cis and trans isomers of Crocin and Crocetin was done by three parameters such as mass spectra registered in the negative ion mode, retention time and absorption ratio related to each metabolites. The variability of these parameters made it possible to detect the Crocins isomer with regard to the attached position and the number of UDP- glucose and Gentiobiosyl molecules to Crocetin structure. Crocins was the mainly detected components as there are polar components that are classified in the carotenoeids groups and the strified form of Crocetin Glucose (β-D-Glucopyranosyl) and Gentiobiose (β-D-Glucopyranosyl-D-Glucose). Also doubly charged ions were found for trans-isomers of Crocin-4, due to the high symmetry of their molecules. Based on the data gathered, the applied chromatograph Machin in this project is accurate and it is most sensitive tools to investigate about plants' natural components like saffron, also the used APCI-MS in negative ions mode is the most efficient method to distinguish different steric forms of Crocin based on the ion's fragments related to united reduction of glycosyl and gentiobiosyl as well as molecular fractions.

Keywords: Saffron, Metabolite, Crocetin, Crocin, Mass spectrometer

1- Assistant Professor of Plant breeding, Genetic Engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Faculty of Agriculture, Meshkin shahr
2- Professor of Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Sari University of Agriculture, Sari, Iran
3- Professor of Plant Biology, Department of Biotechnology, Italian National Agency for New Technologies, Rome, Italy.
4- Associate of Genetic Engineering and Molecular Genetics,Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources Golestan
(* - Corresponding author E-mail: Gmplant21@gmail.com)

www.SID.ir