بررسی میزان رنگیزه کاروتنوئیدی کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در گونه زعفران *Crocus sativus* L. در مناطق قائن و طبس

سمیه تاجیک، فاطمه زرین کمر* و سیده زهرا بطحائی

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲۲

چکیده

زعفران گیاهی دائمی، علفی و زینتی است که می تواند یک دوره خشک را به شکل بنه در زیر خاک و به صورت رکود یا خواب بگذراند. کلاله حاوی سه ترکیب اصلی کروسین (رنگیزه های کاروتنوئیدی محلول در آب)، پیکروکروسین (گلیکوزید تلخ مزه) و سافرانال (جزء اصلی مواد فرار معطر زعفران) می‌باشد. کروسین که از ترکیبات کاروتنوئیدی زعفران است به عنوان ترکیبات ضد سرطان (anticancer) از رشد سلولهای سرطانی جلوگیری می کند. از آنجا که ارزش اقتصادی و کیفیت زعفران وابسته به محتوای ترکیبات کروسین، پیکروکروسین و سافرانال آن می‌باشد، در این مطالعه ضمن تعیین کمی میزان این ترکیبات به روش HPLC در مناطق قائن و طبس، زعفران این مناطق از لحاظ کمی تعیین کیفیت شد.

واژه های کلیدی: زعفران، کروسین، پیکروکروسین، سافرانال، قائن، طبس

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۴۴۰ ، پست الکترونیکی: zarinkamar@modares.ac.ir

مقدمه

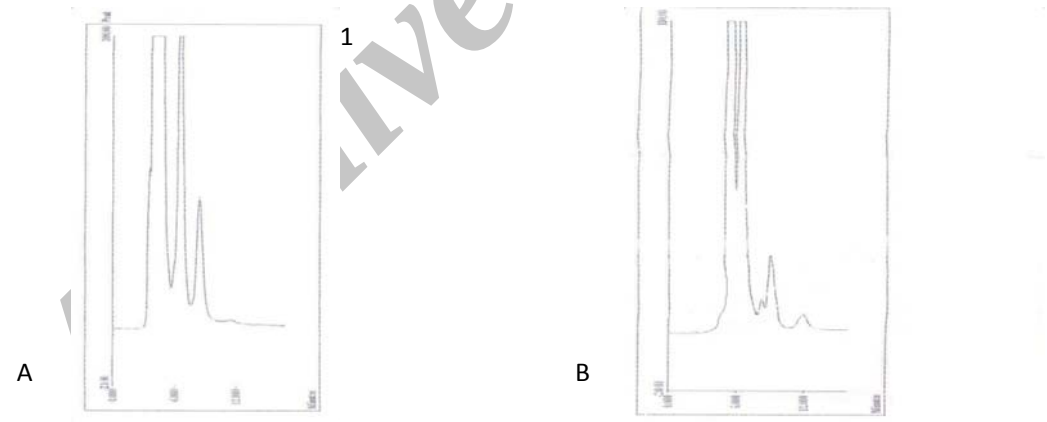
زعفران گیاهی دائمی، علفی و زینتی است که می تواند یک دوره خشک را به شکل بنه در زیر خاک و به صورت رکود یا خواب بگذراند. بنه های آن مدور، سخت، گوشت دار، موازی و قهوه ای رنگ است. این گیاه اغلب دارای ۱ تا ۳ گل می‌باشد و ساقه آن بسیار کوتاه و در زیر سطح خاک قرار دارد (شکل ۱). گل نرماده، جام گل لوله ای باریک و بلند و به رنگ گلپوش است (۸). زعفران از گذشته‌های دورگیاهی شناخته شده بود. اولین زعفرانی که بشر اقدام به کشت آن نمود زعفران زراعی یا *Crocus sativus* L. است که مصرف گسترده‌ای در صنایع مختلف از جمله تغذیه، پزشکی، نساجی و غیره دارد. همچنین به-دلیل نیاز آبی کم، سهولت در کاشت، داشت و برداشت و عملکرد مناسب از اهمیت اقتصادی بسیار زیادی برخوردار است(۸). زعفران از نظر سازگان‌شناختی در شاخه اسپرماتوفیتا (دانه داران)، زیرشاخه نهاندانگان، رده تک‌لپه-ایها، راسته سوسنیها، تیره زنبق و سرده زعفران قرار دارد. این تیره شامل ۶۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه می‌باشد(۱). اگر چه منشاء زعفران ناشناخته است، ظاهراً از نواحی ایران، ترکیه و یونان منشاء گرفته است. اما اکنون زعفران در چندین کشور اروپایی همچون اسپانیا، ایتالیا، فرانسه و سوئیس، همچنین در موراکو، مصر، فلسطین اشغالی، آذربایجان، پاکستان، هند، نیوزیلند، استرالیا و ژاپن با موفقیت کشت شده است. در حالی که تولید سالانه کل زعفران جهان حدود ۱۹۰ تن تخمین زده شده است، ایران بیش از ۹۰ درصد کل را تولید می کند.

زعفران به‌طور عمده به‌عنوان یک ماده رنگ دهنده و طعم دهنده در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می-گیرد. برای تعیین اجزای شیمیایی کلاله های زعفران و مقادیر تقریبی آنها آزمایشهای متعددی انجام گرفته است. بر اساس نتایجی که از تجزیه شیمیایی نمونه های زعفران

www.SID.ir

به‌دست آمده، مشخص گردیده است که مهم ترین مواد مؤثره زعفران عبارتند از: کروسین ها (رنگیزه های کاروتنوئیدی محلول در آب)، پیکروکروسین (گلیکوزید تلخ مزه) و سافرانال که جزء اصلی مواد فرار معطر زعفران را تشکیل می‌دهد و همچنین موادی چون کربوهیدراتها (پکتینها و پنتوزانها)، مواد معدنی، ویتامینها (ویتامین B2)، اسیدهای چرب مانند پالمیتیک اسید، استئاریک اسید و لینولئیک اسید می باشد (۱۲).

شکل۱- A- گونه *Crocus sativus* B: کلاله زعفران



شکل ۲- کروماتوگرام مربوط به رنگیزه کروسین در طول موج ۴۴۰nm; A، نمونه زعفران منطقه قائن; B، نمونه زعفران منطقه طبس; در هر دو کروماتوگرام پیک شماره ۱ مربوط به رنگیزه کروسین می‌باشد.

موارد استفاده زعفران در اروپا و در مشرق زمین بسیار گسترده بوده و از آن به عنوان دارو، رنگ نساجی، عطر و مصارف غذایی در جشنها و اعیاد مذهبی بهره می گرفته اند. از قدیم برای زعفران شماری خواص درمانی قائل بودند: از جمله مصرف آن به‌عنوان آرام بخش، خلط آور، محرک معده، برطرف کننده اسپاسم (گرفتگی) و نیز به عنوان عامل سقط جنین که در برخی موارد با نتایج مرگباری نیز همراه بوده است (۱۳). خوردن زعفران برای تسکین درد دندان، سر درد، رفع بی‌خوابی و دفع سنگ کلیه نیز تجویز شده است. زعفران به دلیل داشتن بوی

www.SID.ir

مطبوع، به عنوان مسکن اعصاب سطحی بدن و به‌خاطر وجود هتروزید تلخ پیکروکروسین به‌عنوان هضم کننده غذا و محرک اشتها گزارش شده است (۲).

اگر چه استفاده دارویی زعفران به‌دلیل کاربردهای گسترده این ماده به عنوان یک ادویه و عامل رنگ دهنده در چند دهه گذشته به‌شدت کاهش یافته است، اما با مشخص شدن نقش زیستی برخی از فرآورده‌های طبیعی آن، به‌ویژه کاروتنوئیدها در کاهش ابتلا به سرطان و همچنین به تأخیر انداختن سرطان زایی که به‌طور گسترده به وسیله تجربیات آزمایشگاهی و اپیدمیولوژیکی (واگیر شناسی) روی حیوانات و انسان نشان داده شده است، بار دیگر مطالعات بر روی خواص دارویی زعفران آغاز گردیده است. با تاثیر عصاره آبی زعفران (کروسین و کروستین) بر روی تومورهای پستانی القاء شده توسط NMU در موش صحرایی، تاثیر درمانی این ترکیبات نیز نشان داده شد (۳ و ۴). تحقیقات دیگر نشان داد که، با افزایش کاروتنوئیدهای کروسین، کروستین و دی متیل کروستین (مشتق صناعی کروستین)، همچنین در اثر میان‌کنش منوترپن آلدئیدهای زعفران با DNA، تغییراتی در طول موجهای جذبی طیف CD و همچنین در پایداری DNAمشاهده شده که در مجموع بیانگر میان‌کنش این ترکیبها با DNA و القای تغییر ساختاری در آن بود (۶ و ۷).

تعیین کیفیت زعفران و قدرت رنگ‌دهی آن به تعیین کمیت آنالوگهای کروسین آن با روشهای مختلف همچون رنگ-سنجی، تکنیکهای کروماتوگرافیک همچون GC-, TLC MSو HPLC وابسته است (۵).

ترکیبات فعال زعفران ۱۱ نمونه تجاری زعفران از کشورهای مختلف به روش HPLC تعیین کیفیت شده است (۵). همچنین مطالعه ترکیبات شیمیایی زعفران از کشورهای مختلف اسپانیا، یونان، چین، هند و ایران مشخص کرده است که مقادیر تخمین زده شده ترکیبات، به روشهای به‌کار گرفته شده جهت خشک کردن، استخراج، جداسازی و تعیین کمیت وابسته است (۵). در یک بررسی دیگر، ۱۰ ترکیب فعال زعفران در سه منطقه مختلف از اسپانیا به روش HPLC به صورت کمی مورد مطالعه قرار گرفت (۱۲).

از آنجا که ارزش اقتصادی و کیفیت زعفران وابسته به تعیین کمی ترکیبات کروسین، پیکروکروسین و سافرانال آن می‌باشد و تاکنون میزان ترکیبات مؤثره زعفران این مناطق به روش HPLC که روشی بسیار دقیق برای تعیین مقدار این ترکیبات می‌باشد صورت نگرفته است، در این مطالعه ضمن تعیین میزان این ترکیبات به وسیله دستگاه HPLC از مناطق قائن و طبس (با توجه به اینکه بالاترین کیفیت زعفران متعلق به قائن و کمترین کیفیت مربوط به طبس می باشد) زعفران این مناطق از لحاظ کمی تعیین کیفیت شد.

مواد و روشها

در این تحقیق گونه *Crocus sativus* از دو منطقه قائن با ارتفاع ۱۴۰۰متر و طبس با ارتفاع ۷۰۰ متر هنگام گل دهی در آبان ماه جمع آوری شد. منطقه قائن در شرق ایران و شمال استان خراسان جنوبی در حد فاصل ۳۴ درجه و ۱۲دقیقه عرض جغرافیایی و ۶۰ درجه و ۵۷ دقیقه طول جغرافیایی قرار دارد. طبس در شمال شرق استان یزد، در مدار ۳۳ درجه و ۳۵ دقیقه عرض جغرافیایی و ۵۶ درجه و ۵۵ دقیقه طول جغرافیایی، در منطقه ای با آب و هوای بیابانی واقع شده است.

مطالعه کمی و کیفی کاروتنوئیدها به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC): ترکیبات کاروتنوئیدی کلاله *Crocus sativus* به وسیله HPLC جداسازی و درصد این ترکیبات در هر دو منطقه تعیین شد. در بررسی کمی و کیفی انواع کاروتنوئیدهای کلاله زعفران، آنالیز عصاره های خام با روش HPLC به خاطر

Archive of SID
www.SID.ir

دقت و حساسیت و کارآیی فوق العاده آن در جداسازی مواد از ارزش ویژه ای برخوردار است (۵).

آماده سازی نمونه و مواد شیمیایی: پس از جمع آوری نمونه‌ها از مناطق قائن و طبس در سال ۱۳۸۶و ۱۳۸۷، کلاله گلها از آنها جدا شد و در درون انکوباتور در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد حدود ۲۴ ساعت خشک شدند. سپس کلاله ها پودر شده و تا هنگام انجام آنالیز HPLC در درون شیشه‌های تیره رنگ و در دمای ۴ درجه نگهداری شدند. از ۲- نیتروآنیلین به عنوان استاندارد داخلی برای آنالیزهای HPLC استفاده شد.

استخراج: برای سنجش ترکیبات کاروتنوئیدی ۰/۰۲گرم از نمونه زعفران وزن شد و به حدود ۵۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه و ۵۰۰ میکرولیتر متانول در درون لوله اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت روی استریر در دمای ۴ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار داده شد تا ترکیبات زعفران کاملاً استخراج شوند. بعد از استخراج محلول رویی با سمپلر برداشته شد و با سرعت g ۱۵۰۰۰ به مدت ۳۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی از غشاهای نایلونی (آکرودیسک ۱۳، سایز منافذ ۰/۴۵ میکرومتر× ۱۳ میلی متر قطر واترز) عبور داده شد، تا عصاره جهت تزریق به HPLC خالص باشد. قبل از آنالیزهای کروماتوگرافی ۵۰۰ میکرولیتر از نیتروآنیلین به عنوان استاندارد داخلی به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه اضافه و به‌خوبی با هم مخلوط شد (۹).

تجهیز HPLC : دستگاه HPLC مورد استفاده Philips با آشکارساز Pu 41110, UV-visible و مجهز به ستون (C18: 250 mm- 4mm) بود. تزریق توسط سرنگ هامیلتون انجام گرفت. تمام حلالهای مورد استفاده در این آزمایشات مخصوص HPLC بوده و قبل از استفاده به وسیله فیلترهای سلولز استاتی با منافذی به قطر ۰/۴۵ میکرون فیلتر و سپس هواگیری شد. آنالیز HPLC روی یک سیستم انتقال دو حلاله انجام شد که با یک پمپ همراه شده است.

تعیین کمی: از یک ستون C18 برای آنالیز استفاده شد و یک گرادیان ۵۰/۵۰ از متانول و آب (۱۵ درصد استونیتریل) به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۱میلی لیتر در دقیقه با زمان ۲۵ دقیقه در دمای اتاق، مقدار تزریق نمونه ۱۰ میکرولیتر می‌باشد. آنالیزها برای هر نمونه سه بار تکرار شد. پیکروکروسین در ۲۵۰ نانومتر، کروسین در ۴۴۰ نانومتر و سافرانال در ۳۱۰ نانومتر و استاندارد داخلی در بالای هر سه طول موج تشخیص داده شد (۹). مقدار هر ترکیب با استفاده از سطح زیر منحنی به دست آمد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از تزریق ترکیبات استاندارد محاسبه گردید. منحنی استاندارد نیز از تزریق غلظتهای مختلف ترکیبات استاندارد به دست آمد.

نتایج و بحث

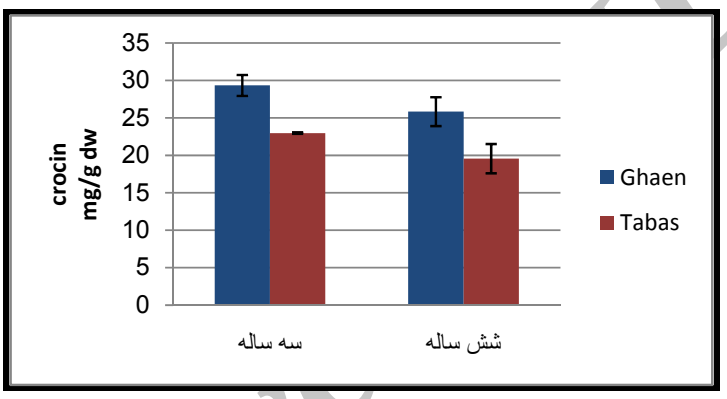
نتایج حاصل از سنجش ترکیبات کاروتنوئیدی و منوترپن آلدئید *Crocus sativus* از دو منطقه قائن و طبس: در نمونه‌های زعفران دو منطقه قائن و طبس سه ترکیب کروسین، پیکروکروسین و سافرانال شناسایی شد. هر ترکیب به وسیله مقایسه زمان بازداری (RT) آن با ترکیب استاندارد شناسایی شد. شکل ۲ کروماتوگرام مربوط به رنگیزه کروسین در منطقه قائن و طبس را نشان می‌دهد که در طول موج ۴۴۰ nm شناسایی شده است.

آنالیز کمی: نتایج نشان می‌دهد به طور کلی منطقه قائن دارای زعفرانی با ترکیبات کروسین، پیکروکروسین و سافرانال بیشتری نسبت به طبس می‌باشد (نمودارهای ۳-۱). کروسین و پیکروکروسین به‌طور طبیعی در کلاله در طول فرآیند خشک‌شدن، ذخیره و استخراج تجزیه می‌شوند که این عمل به دما، رطوبت و تابش نور وابسته می‌باشد (۱۰ و ۱۱). تفاوت این ترکیبات در دو منطقه می‌تواند به دلیل شرایط خشک کردن، یا زمان و شرایطی که گیاه تحت آن تولید، برداشت و ذخیره شده است، باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

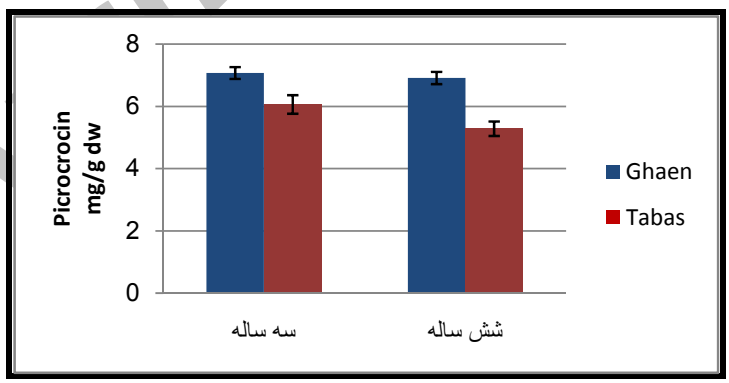
جدول۱- مقایسه میانگین میزان کروسین، پیکروکروسین و سافرانال کلاله مناطق قائن و طبس در دو سال ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷

ترکیب	قائن		طبس	
	۳ ساله	۶ ساله	۳ ساله	۶ ساله
کروسین	۲۹/۳۳±۱/۰۹	۲۵/۸۳±۱/۳۰	۲۲/۹۷±۰/۱	۱۹/۵۶±۱/۵۲
پیکروکروسین	۷/۰۷±۰/۱۶	۶/۹۱±۰/۱۵	۶/۰۶±۰/۲۳	۵/۲۸±۰/۱۸
سافرانال	۳۰/۴۹ ±۶/۱۷	۱۵/۶۹±۴/۰۳	۲۲/۳±۱/۰۲	۲۰/۰۹±۱/۶۱



نمودار۱- مقایسه میزان کروسین مزارع سه ساله و شش ساله در دو سال متوالی ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷

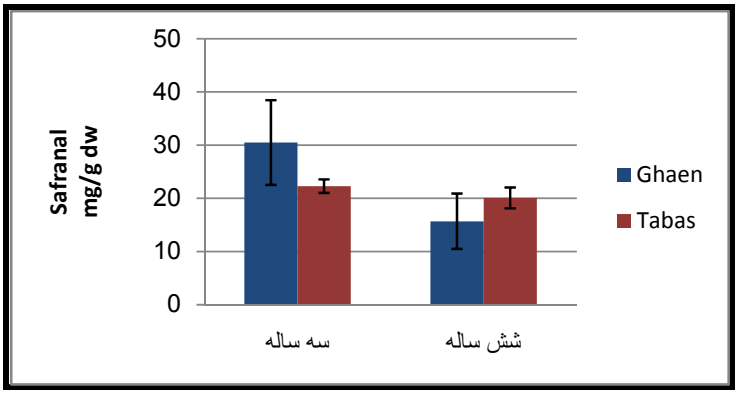
(a'b ', bb ,a,a ,a,b) تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد (p<0.001



نمودار۲- مقایسه میزان پیکروکروسین مزارع سه ساله و شش ساله در دو سال متوالی ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷

(aa تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد **p<0.05**, ab, a'b , bb, تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد **p<0.001**)

www.SID.ir



نمودار۳- مقایسه میزان سافرانال مزارع سه ساله و شش ساله در دو سال متوالی ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷
(p<0.001 تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد a a, b, a,b,b', a'b')

تفاوت میزان ترکیبات موجود در کلاله زعفران در مکانهای مختلف را عمدتاً ناشی از تفاوت محیط، ژنتیک (واریته) و فعالیتهای کشاورزی دانستند (۵). با توجه به اطلاعات کسب شده از دو منطقه افزایش میزان ترکیب سافرانال در مزارع شش ساله منطقه طبس نسبت به قائن می‌تواند به شرایط خشک کردن و ذخیره سازی مرتبط باشد. علاوه بر وجود سافرانال در کلاله، مقداری نیز طی شرایط خشک کردن و ذخیره سازی از پیکروکروسین ایجاد می‌شود که می تواند دلیلی بر افزایش آن در منطقه طبس باشد (جدول ۱).

از آنجا که محصول زعفران با سال و سن بنه رابطه دارد و از سال اول تا سوم افزایش می‌یابد (۱۰) و بررسیهای دیگر نیز به تأثیر سن گیاه بر میزان متابولیتهای ثانویه اشاره کردند (۱۴). بنابراین در این مطالعه مقایسه ترکیبات مؤثره زعفران در مزارع با سنین سه ساله و شش ساله صورت گرفت که نتایج حاکی از افزایش میزان آنها در مزارع سه ساله نسبت به شش ساله می باشد، این تفاوت میزان می‌تواند به‌دلیل کاهش سایز بنه در مزارع شش ساله نسبت به سه‌ساله، نزدیک شدن بنه به سطح خاک و کاهش دستیابی به املاح و عناصر موجود و کاهش فعالیت آنزیمهای بیوسنتزی دخیل در سنتز این ترکیبات باشد.

منابع

۱. ابراهیم زاده، حسن. رجبیان، طیبه. کرمیان، رویا. ابریشم چی، پروانه. صبورا، عذرا (۱۳۸۵). زعفران ایران با نگاه پژوهشی. انتشارات اطلاعات، ص ۶۴۴ .

۲. ابریشمی، محمد حسن. ۱۳۶۶. شناخت زعفران ایران، تهران، انتشارات توسن.

۳. چیت سازان، آرش. (۱۳۸۵). بررسی تاثیر عصاره آبی زعفران، کروسین و کروستین بر تومورهای پستانی القا شده توسط NMU در موش صحرایی ماده. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

۴. هوشیار، ریحانه (۱۳۸۷). بررسی ارجحیت میانکنش اجزای مولکولی زعفران نسبت به توالی‌های ویژه الیگونوکلئوتیدی و اثر آنها بر کمپلکس الیگونوکلئوتید- هیستون H1 در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

5. Abdullave, F., Ortega, C., 2007. HPLC quantification of major active components from different saffron(Crocus sativus L) sources. Food Chemistry 10. 1126-1131.

6. Bathaie, S. Z., Hoshyar, R., Rangbar, B., Sabouni, F. and Moosavi-Movahedi, A. 2007. Interaction of saffron carotenoids as anticancer compounds with ctDNA, oligo (dG,dC) 15 and oligo (dA, dT) 15. DNA Cell Biology 26: 533-540.

7. Bathaie, S. Z., Bolhasani A., Moosavi-Movahedi, A., Ranjbar, B. and Ghafari, M.

Archive of SID
www.SID.ir

2002. Interaction of purified crocin from Iranian saffron with DNA. Biophys. J. 82: 687a.
8. Fernandez, J., 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Research Development of Plant Science. 2: 127-159.
9. Hoshyar, R. Bathaie, S.A. 2007. Quantitative, HPLC analysis of monoterpene aldehydes in different sources of Iranian saffron. The 9th Iranian Congress of Biochemistry and the 2nd International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Shiraz, Iran. October. 29,1.
10. Lage, M. Cantrell, C. 2009. Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. Scientia Horticulturae 121: 366–373.
11. Loskutov A., Beninger C., Hosfield G., Sink K. 2000. Development of an improved procedure for extraction and quantification of safranal in stigmas of *Crocus sativus* L.using high performance liquid chromatography. Food chemistry. 69: 87-95.
12. Lozano, P., Castellar, M., Simancas, M., Iborra, L. 1999. Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. Journal of Chromatography. 830: 477-483.
13. Sampathu, S, R., Shivashankar, S. and Lewis, Y. S. 1984. Saffron (*Crocus sativus* L.) cultivation, processing, chemistry and standardization. In Critical Reviews in food sciences and nutrition. ED.E. Furiya. CRC. PRESS Inc., Boca Raton, Floria. 123-157.
14. Spitaler, R., Schlorhaufer, P.D., Ellmerer, E., P., Merfort, I., Bortenschlager, S., Stuppner, H., Zidorn, C., 2006. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heades of Arnica. Montana. Phytochemistry. 67: 409-417.

Quantification of crocin, picrocrocin and safranal components of saffron (*Crocus sativus* L.) in Ghaen and Tabas regions

Tajik S., Zarinkamar F and Bathaie Z.

Plant Science Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a perennial herbaceous rosette, which has permanent underground stem bases called bulb or corm and purple petal and red three branches stigmas. The stigmas contain three major compound, crocins (carotenoids compound responsible for color), picrocrocin (responsible for taste) and safranal (responsible for odor). Crocin that is carotenoids compound of saffron as an anticancer prevents cancer cell development. In this research saffron collected from Ghaen and Tabas regions was quantified by HPLC and qualified.

Keywords: saffron, crocin, picrocrocin, safranal, Ghaen, Tabas

Archive of SID

www.SID.ir