فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۳، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۶۸-۲۶۲ (۱۳۸۶)

تأثیر مدت زمان نگهداری کلاله زعفران (*Crocus sativus* L.) بر میزان ترکیب Crocin

کامکار جایمند[۱]، محمدباقر رضایی[۱] و اکبر نجفی آشتیانی[۲]

۱- عضوهیئت علمی‌مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، پست الکترونیکی: Jaimand@rifr-ac.ir
۲- کارشناس مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) از گیاهان مهم ایران است که در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. بخش اعظم زعفران دنیا را استان خراسان تأمین می‌نماید. از کلاله زعفران خشک به عنوان رنگ، رایحه، و به عنوان دارو در داروسازی استفاده می‌گردد. دراین تحقیق تأثیر شرایط نگهداری کلاله زعفران بر میزان ترکیب کروسین زعفران مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها در آذر ماه سال ۱۳۸۲ از مزرعه‌ای در منطقه تربت حیدریه جمع‌آوری و به مدت ۲۰ ماه، در شرایط نور، محیط تاریک و در یخچال نگهداری گردید. پس از تهیه عصاره، میزان ترکیب کروسین با دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت. میزان این ترکیب در شرایط نور، تاریکی و یخچال به ترتیب ۰/۰۳۲ درصد، ۰/۰۳۸ درصد و ۰/۰۲۸ درصد بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده بهترین شرایط نگهداری کلاله زعفران جهت حفظ بیشتر ترکیب کروسین، محیط تاریک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: زعفران، کروسین، شرایط نگهداری، HPLC.

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی علفی و چند ساله، بدون ساقه، دارای پیاز غده‌ای کروی شکل از خانواده زنبقی‌ها (Iridacea) می‌باشد. فرآورده تجارتی آن شامل کلاله و ناحیه انتهایی خامه گل است. از زعفران در طب سنتی به عنوان گیاه شادی آور یاد می‌شود (میر حیدر، ۱۳۷۲ و زرگری، ۱۳۶۹) میزان تولید زعفران در کل جهان در سال ۱۹۹۹- ۱۹۹۸، ۱۴۰ تن بوده که ۱۲۰ تن آن متعلق به کشور ایران می‌باشد. زعفران از گیاهان مهم استان خراسان بوده که شهرستانهای این استان درصد اعظم زعفران دنیا را تأمین می‌نمایند.

زعفران دارای تعدادی ترکیب مهم می‌باشد که برای آن خواص بیولوژیکی فراوان ذکر کرده‌اند. یکی از این ترکیبها کروسین (Crocin) است.

کروسین، ترکیبی کارتنوییدی و قابل حل در آب می‌باشد که عامل رنگ زعفران است. این ترکیب پیش ساز ویتامین A نبوده، بنابراین تجویز آن در دوزهای بالا به دلیل سمیت کمتر از مشتقات ویتامین A، امکان‌پذیر می‌باشد.

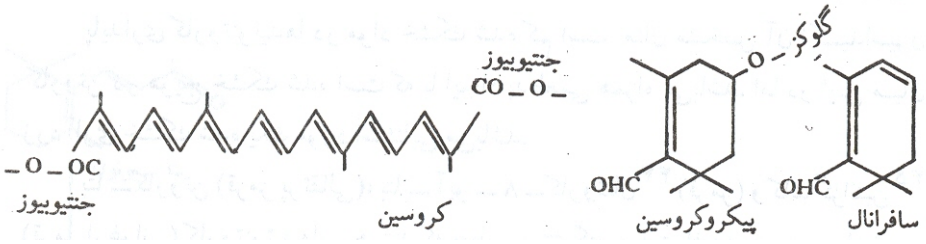
زعفران علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلولهای لوسمی انسان و دیگر مدلهای سرطانی عملکرد خوبی داشته و باعث بهبودی در گردش خون، درمان بیماریهای قلبی و عروقی، درمان کوفتگی و ضرب‌دیدگیها،

هپاتیت، افزایش بیگانه‌خواری ماکروفاژ و افزایش ایمنی بدن می‌شود. حساسیت نسبت به این ماده فوق‌العاده نادر گزارش شده است (Nair, *et al.* 1995; Abdullaev, 2002; Tarantilis, *et al.*, 1994).

کروسین ترکیبی گلیکوزیدی است که دارای دو مولکول جنتوبیوز می‌باشد (فاطمی، ۱۳۸۰). کروسین در اثر اکسیداسیون نوعی کارتنویید به نام پروتوکروسین بوجود می‌آورد که ماده‌ای رنگی است و در اثر هیدرولیز به کروسین تبدیل می‌شود (مؤمنی، ۱۳۷۹). علاوه بر کروسین، زعفران حاوی آگلیکون کروستین به صورت آزاد و مقادیر کمی‌رنگدانه آنتوسیانین می‌باشد (صداقت، ۱۳۷۹). کروسین در اثر جدا کردن دو مولکول قند جنتوبیوز از کروستین بدست می‌آید که ساختمان کلی آن همچون رشته آلیفاتیک کاروتن‌ها می‌باشد (فاطمی، ۱۳۸۰).

از کروسین به ویژه کروسین ۱ که سبب جلوگیری از رشد تومورها می‌شود و میزان انتشار اکسیژن به مویرگهای سلولهای آندوتلیوم و بافتهای دیگر را افزایش می‌دهند استفاده زیادی می‌نمایند. کروسین‌ها یا با نابود کردن سلولهای سرطانی و یا به تعویق انداختن شروع حالت سرطان زدایی تومورها، سبب کنترل تومورها می‌گردند. همچنین کروسین یک ماده با خاصیت ضد سکته‌ای (anti-apoplectic) می‌باشد. با شروع مطالعات در زمینه کشت بافت سلولهای جانوری مشخص شد که در محیط لوله آزمایش (in vitro) کروسین قادر است از تخریب سلولهای مغزی به علت تیمار این سلولها با اتانول جلوگیری کرده، سبب عمر بیشتر این سلولها گردد و این نوید را به دانشمندان دهد که روزی از آن به عنوان یک دارو برای تقویت حافظه و افزایش ضریب یادگیری استفاده کنند. همچنین مشخص شد که کروسین با ممانعت از بیان عامل آلفا-NTF سلولهای مغزی را محفوظ نگه می‌دارد چون طبق بیان بالا، این ژن سبب ایجاد حالت آپوپتوسیس (Apoptosis) سلولها شده و ماده وراثتی این سلولها را قطعه قطعه می‌کند.

از کروسین برای ایجاد رنگ در نوشابه‌ها و فرآورده‌های آردی استفاده می‌شود. این ماده یک گلیکوزید است که دارای دو مولکول جنتیوبیوز (gentiobiose) می‌باشد. بعد از جدا کردن جنتیوبیوز، ماده‌ای موسوم به کروستین (Crocetin) باقی می‌ماند که ساختمان کلی آن نظیر رشته آلیفاتیک کاروتن‌ها است. از زعفران همچنین ماده تلخ مزه پیکروکروسین (Picrocrocin) بدست می‌آید که گلیکوزید است و بعد از جدا کردن گلوکز، سافرانال (Saffranal) می‌دهد (فاطمی، ۱۳۸۰). کروسین یک کارتنویید ۲۰ کربنه دی کربوکسیلیک است که به صورت استر گلوکوزیل در کلاله زعفران و میوه روناسیان (gardenia) یافت می‌شود. کروستین نیز مانند کروسین خاصیت تسکین دهندگی داشته و با تولید رادیکالهای آزاد سبب ممانعت از بروز حالت سرطانی سلول می‌گردد.



کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) تکنیک مناسبی برای جداسازی و اندازه‌گیری محصولات طبیعی، مواد دارویی و بیوشیمیایی می‌باشد. یکی از روشهای دقیق جهت اندازه‌گیری ترکیب کروسین استفاده از HPLC می‌باشد.

مواد و روشها

الف – روش استخراج ترکیبهای زعفران

نمونه‌های گل گونه .*Crocus sativus* L در اواسط شهریور ماه ۱۳۸۳ از مزرعه‌ای در منطقه تربت حیدریه جمع‌آوری گردید. ابتدا پس از جداسازی کلاله‌ها از گلبرگهای گیاه، مقدار ۱ گرم از آن را وزن کردیم. سپس همراه با ٦ میلی لیتر متانول، عصاره آن توسط دستگاه سونیکتت (ارتعاش صوتی) جداسازی گردید. پس از آماده‌سازی نمونه جهت شناسایی و بررسی میزان ترکیب کروسین، آن را به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) تزریق نمودیم.

ب – شرایط دستگاهی HPLC برای تعیین میزان ترکیب Crocin

دستگاه کروماتوگرافی از شرکت Knuer، مدل Well Chrom 2000، پمپ Maxi-star K-1000 و دتکتور spectrophotometer K-2500 می‌باشد. این دستگاه در ٤٤٠ نانومتر تنظیم گردیده است. ستون مورد استفاده Erospher 100 C_{18} به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ٤ میلیمتر و فاز متحرک اتیل استات، ایزوپروپانل و آب (٥٦ : ۳٤ : ۱۰) با شدت جریان ۰/٦ میلی لیتر در دقیقه است، مقدار ۲۰ μl میکرومیلی لیتر از نمونه به مدت ٤۰ دقیقه به دستگاه تزریق گردید.

ج - تهیه محلول استاندارد

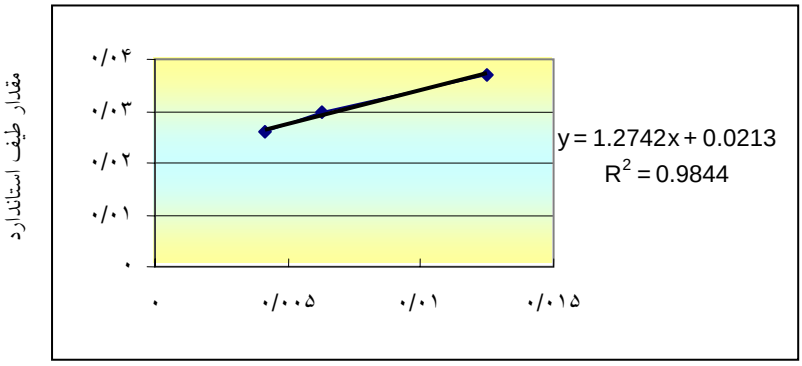
جهت تهیه منحنی استاندارد ترکیب Crocin ($C_{44}H_{64}O_{24}$ M_r 976.98) از شرکت Fluka خریداری گردید. نمونه استاندارد با متانول در سه رقت مختلف (۰/۰۲٤، ۰/۰٤۸ و ۰/۰۷۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر) تهیه گردید.

د - رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد

منحنی استاندارد توسط غلظت‌های متفاوت از نمونه کروسین (سه نمونه با غلظت‌های ۰/۰۲٤، ۰/۰٤۸ و ۰/۰۷۲ میلی‌گرم در میلی لیتر) و با تزریق به دستگاه تهیه می‌گردد. سپس سطح زیر طیف ماده مجهول با انطباق آن با نمودار کالیبراسیون، غلظت ماده مجهول بدست می‌آید.

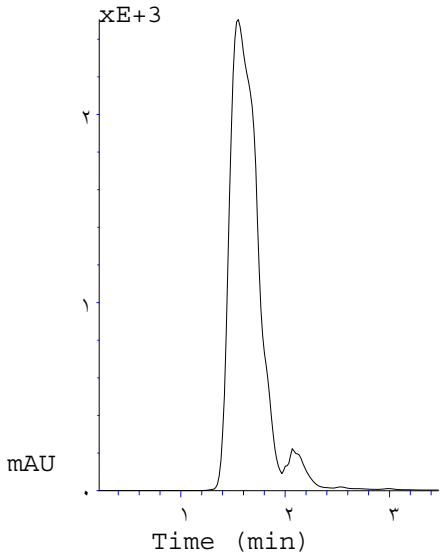
نتایج

نتایج این تحقیق تأثیر شرایط نگهداری کلاله زعفران (*Crocus sativus* L.) را بر میزان ترکیب Crocin در نمونه‌های جمع‌آوری شده شهرستان تربت حیدریه (آذر ۱۳۸۲) را نشان می‌دهد. میزان این ترکیب در نمونه‌ای که در معرض نور بود ۰/۰۳۲ درصد، در محیط تاریک ۰/۰۳۸ درصد و در یخچال ۰/۰۲۸ درصد بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده بهترین شرایط نگهداری کلاله زعفران در محیط تاریک می‌باشد

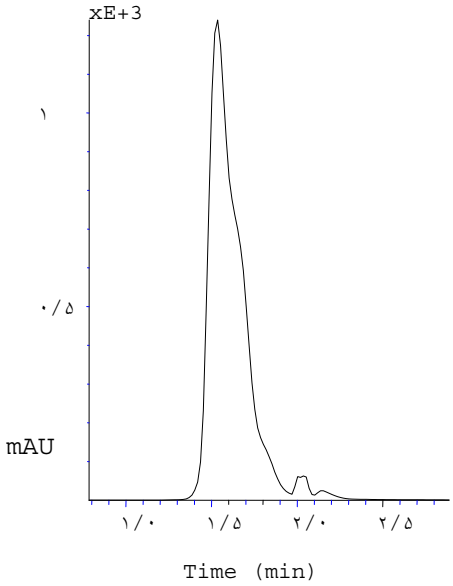


غلظتهای استاندارد در حلال میلی‌گرم در میلی لیتر

شکل۱- منحنی کالیبراسیون استاندارد کروسین



شکل ۲- کروماتوگرام نمونه زعفران تربت حیدریه ۲۰ ماه در معرض نور



شکل ۳- کروماتوگرام استاندارد ترکیب کروسین با غلظت ۱/۱۴۴ میلی‌گرم در میلی لیتر

جدول ۱- تأثیر شرایط نگهداری بر میزان ترکیب کروسین

شرایط نگهداری	میزان ترکیب کروسین	مقدار به **ppm**
۲۰ ماه در معرض نور	۰/۰۳۲ درصد	۳۲۰
۲۰ ماه در یخچال صفر درجه	۰/۰۲۸ درصد	۲۸۰
۲۰ ماه در محیط تاریک	۰/۰۳۸ درصد	۳۸۰

بحث

همان طور که از نتایج مشاهده می‌شود مقدار رنگدانه‌های کروسین در نمونه‌های کلاله خشک شده در تاریکی بیشتر از دو نمونه دیگر است. در تحقیقی که Raina و همکاران (۱۹۹٦) انجام دادند، نمونه‌های زعفران را در دمای ۵۰ و ٦۰ درجه سانتیگراد خشک نموده و سپس نتایج نشان داد که مقادیر رنگدانه‌های کروسین بیشتر از نمونه خشک شده در سایه بود. این محققان طولانی بودن زمان خشک شدن برای کلاله زعفران، در روش سایه را عامل ادامه یافتن فعالیتهای آنزیمی و غیر آنزیمیو در نتیجه کاهش قابل توجه مقادیر رنگدانه‌های کروسین دانسته‌اند. تحقیقات همتی کاخکی (۱۳۷۰)، حسینی (۱۳۷٦) و عاطفی (۱۳۷۸) نیز همین نتیجه را برای زعفران نشان داده‌اند. در این تحقیق نیز نمونه‌های کلاله زعفران به مدت ۲۰ ماه، درشرایط نور، محیط تاریک و در یخچال نگهداری گردید. با توجه به نتایج بدست آمده جهت حفظ ترکیب کروسین برای دراز مدت، بهترین شرایط نگهداری در محیط تاریک می‌باشد.

کروسین و رنگدانه‌های کروسین محلول در آب زعفران کارتنوییدهایی با واحدهای قندی هستند که به راحتی در مجاورت رطوبت تحت اثر عواملی نظیر حرارت، اکسژن و نور تغییر ماهیت می‌دهند. همچنین جدا شدن بخشهای قندی (توسط آنزیم بتا-گلوکوزیداز) با کاهش در حالت منجمد و در فشار پایین، فعالیتهای آنزیمی و غیر آنزیمی تا حد زیادی کاهش می‌یابد. در سایر روشهای خشک کردن حرارتی و یا سنتی بسته به شرایط بکار رفته تغییرات حاصل از فعالیتهای آنزیمی و غیر آنزیمی بیشتر رخ می‌دهند.

بررسی نتایج تأثیر مدت زمان (۲۰ ماه)، درشرایط نور، محیط تاریک و در یخچال نشان داد که نمونه‌های کلاله زعفران نگهداری شده در سرما دارای میزان کمتری کروسین نسبت به نمونه‌های در نور و تاریکی داشت. بنابراین با توجه به این که تولیدکنندگان و یا خریداران گل نسبت به خرید زیاد آن اقدام می‌نمایند، بهتر است جهت حفظ این ترکیب مهم در طول جداسازی کلاله و زمان فروش در فروشگاهها نسبت به نگهداری زعفران، دور از نور و حرارت اقدام نمایند. در غیر این صورت فقط زعفرانی را به فروش می‌رسانند که خواص اولیه گیاه را نخواهد داشت. درضمن پیشنهاد می‌شود، با توجه به اهمیت کلاله زعفران و از لحاظ استراتژیک بودن آن بهترین روش شناسایی ترکیبهای مهم در زعفران از جمله کروسین بهتر است از دستگاه HPLC استفاده گردد.

منابع مورد استفاده

- حسینی، ع.، ۱۳۷۶ . فرآوری زعفران. مؤسسه کشاورزی و خدمات زعفران کاری زرگل.
- زرگری، ع .، ۱۳۶۹ . گیاهان دارویی. چاپ پنجم. انتشارات دانشگاه تهران، جلد چهارم، ۹۲۴ صفحه.
- صداقت، ن.، ۱۳۷۹. تکنولوژی بسته بندی مواد غذایی. دقت، ۲۳۲ صفحه.
- عاطفی، م.، ۱۳۷۸ . بررسی اثر خشک کردن انجمادی بر فاکتورهای کیفی زعفران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی.
- فاطمی، ح.، ۱۳۸۰ . شیمی مواد غذایی. شرکت سهامی انتشار، ۴۸۰ صفحه.
- مؤمنی، ت.، ۱۳۷۹. عصاره‌های گیاهی. شهید فرهاد رضا. ۱۴۸ صفحه.

- میرحیدر، ح.، ۱۳۷۲ . معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماریها. دفتر نشر فرهنگ اسلامی تهران، جلد دوم، ۵۳۵ صفحه.
- همتی کاخکی، ع.، ۱۳۷۰ . گزارش طرح پژوهشی: بررسی تأثیر روشهای مختلف خشکانیدن در کیفیت زعفران. سازمان پژوهشهای علمیو صنعتی ایران ، پژوهشکده خراسان.
- Abdullaev, F.I., 2002. Cancer Chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental Biology and Medicine, 227: 20-25.
- Nair, S.C., Kurumboor, S.K. and Hasegawa, J.H., 1995. Saffron Chemoprevention in biology and medicine: a review. Cancer Biotherapy, 10: 257-264.
- Raina, B.L., Agarwal, S.G., Bhatia, A.K., Gaur, G.S., 1996. Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. Journal of Science Food and Agriculture, 71: 27-32.
- Tarantilis, P.A., Morjani, H., Polissiou, M. and Manfait, M., 1994. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L.. Anticancer Research, 14: 1913-1918.

The effect of storing period of *Crocus sativus* L. Stigma on crocin content

K. Jaimand[1], M.B. Rezaee[1] and A. Najafi Ashtiany[1]

1- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O.Box 13185-116, Tehran- Iran. E-mail: Jaimand@rifr-ac.ir

Abstract

Crocus sativus L. is one of the most important plants in Khorasan provience and exported to the whole world. It is used in food for color and flavour and also in medicine. In this study effects of storage condition of *Crocus sativus* L. for determining crocin were under investigation in Khorasan Provience. Samples were collected on November 2003. We kept samples for 20 months in three different conditions as light, darkness and refrigerator on zero degree. On November 2005 samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) which crocin percentage content in light were 0.032%, dark 0.038% and refrigerator 0.028%. According to the results the best condition to kept stigmata is darkness.

Key words: *Crocus sativus* L., crocin, storage condition, HPLC.