



فصل نامه‌ی داروهای گیاهی

journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir



تأثیر شرایط محیط کشت و نگهداری کلاله زعفران (*Crocus sativus* L.) بر میزان ترکیب

کروسین

کامکار جایمند^۱، محمد باقر رضایی^{۲*}، اکبر نجفی آشتیانی^۳

۱. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، صندوق پستی ۱۱۶ - ۱۳۱۸۵، تهران، ایران؛

* مسئول مکاتبات: mrezaee@rifr-ac.ir

چکیده

شناسه‌ی مقاله

مقدمه و هدف: زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) به مقدار وسیعی در صنایع غذایی استفاده می‌شود. زعفران به عنوان رنگ و طعم دهنده کاربرد دارد. کلاله زعفران دارای کارتنوئیدهای کمی محلول در آب و دارای ترکیب عمده کروسین می‌باشد که این ترکیب دارای اثرات مهمی علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلول‌های لوسمی انسان و دیگر مدل‌های سرطانی عملکرد خوبی داشته است. در این تحقیق به تأثیر شرایط محیط کشت و نگهداری کلاله زعفران (*Crocus sativus* L.) بر میزان ترکیب Crocin در دو استان تهران و مرکزی پرداختیم.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۷/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۷/۳۰
نوع مقاله: پژوهشی-کوتاه
موضوع: فراوری و فرآیندهای پس از برداشت

روش تحقیق: نمونه‌های مورد آزمایش از تربت حیدریه در آذر سال ۱۳۸۵ جمع‌آوری و تحت شرایط مختلف محیطی کرج و خمین به مدت ۲۰ ماه در شرایط نور، محیط تاریک و در یخچال قرار دادیم. سپس نمونه‌ها در مرداد ۱۳۸۷ جهت اندازه‌گیری میزان ترکیب Crocin با دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت.
نتایج و بحث: نتایج این تحقیق میزان ترکیب Crocin در شرایط مختلف نگهداری کلاله زعفران از شهرستان کرج، به ترتیب در معرض نور ۰/۰۲۹ درصد، در محیط تاریک ۰/۰۴۱ درصد و در یخچال صفر درجه ۰/۰۳۰ درصد بدست آمد. نتایج این تحقیق میزان ترکیب Crocin در شرایط مختلف از شهرستان خمین، در معرض نور ۰/۰۳۰ درصد، در محیط تاریک ۰/۰۳۰ درصد و در یخچال صفر درجه ۰/۰۲۸ درصد بدست آمد.
توصیه کاربردی / صنعتی: با توجه به نتایج بدست آمده، شرایط مناسب نگهداری کلاله زعفران در محیط تاریک پیشنهاد می‌گردد.

کلید واژگان:

- ✓ زعفران
- ✓ کروسین
- ✓ شرایط نگهداری
- ✓ HPLC

مدل‌های سرطانی عملکرد خوبی داشته است (Nair *et al.*, 1995 ; Abdullaev, 2002; Tarantilis, *et al.*, 1994).

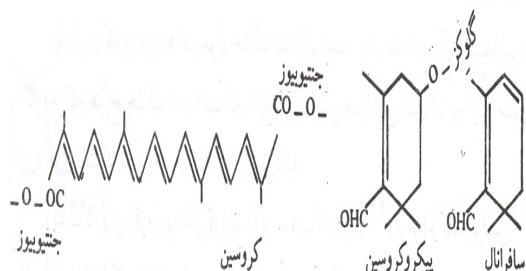
زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی علفی و چند ساله، بدون ساقه، دارای پیاز غده‌ای کروی شکل از خانواده زنبق (Iridaceae) می‌باشد. عصاره‌های کلاله و گلبرگ زعفران اثرات

۱. مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) از گیاهان مهم استان خراسان بوده که درصد اعظم زعفران دنیا را تأمین می‌نماید. امروزه مطالعات وسیعی در مورد اثرات مختلف زعفران صورت گرفته است. این تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره زعفران علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلول‌های لوسمی انسان و دیگر

مغزی به علت تیمار این سلول ها با اتانول جلوگیری کرده، سبب عمر بیشتر این سلول ها 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 فاکتور آلفا - NTF سلول های مغزی را محفوظ نگه می دارد چون که بیان بالای این ژن سبب ایجاد حالت آپوپتوسیس (Apoptosis) سلول ها شده و ماده وراثتی این سلول ها را قطعه قطعه می کند.

از کروسین برای ایجاد رنگ در نوشابه ها و فرآورده های آردی استفاده می شود. این ماده یک گلیکوزید است که دارای دو ملکول جنتیوبیوز (Gentiobiose) می باشد (شکل ۱). بعد از جدا کردن جنتیوبیوز، ماده ای موسوم به کروسین (Crocetin) باقی می ماند که ساختمان کلی آن نظیر رشته آلیفاتیک کاروتن ها است. از زعفران همچنین ماده تلخ مزه، پیکروکروسین (Picrocrocin) بدست می آید که گلیکوزید است و بعد از جدا کردن گلوکز، سافرانال (Saffranal) می دهد (فاطمی، ۱۳۸۰). کروسین یک کارتنوئید ۲۰ کربنه دی کربوکسیلیک است که به صورت استر گلوکوزیل در کلاله زعفران و میوه روناسیان (Gardenia) یافت می شود. کروسین نیز مانند کروسین خاصیت تسکین دهندگی داشته و با تولید رادیکال های آزاد سبب ممانعت از بروز حالت سرطانی سلول می گردد.



شکل-۱. ساختار کروسین، جنتیوبیوز، پیکروکروسین و سافرانال

کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) روش مناسبی برای جداسازی و اندازه گیری محصولات طبیعی، مواد دارویی و بیوشیمیایی می باشد. یکی از روش های دقیق جهت اندازه گیری ترکیب کروسین استفاده از HPLC است.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. روش استخراج ترکیب های زعفران

نمونه های گل گونه *Crocus sativus* L. در اواسط شهریور ماه ۱۳۸۵ از مزارع تربت حیدریه جمع آوری گردید. ابتدا پس از جداسازی کلاله ها از گلبرگ های گیاه، مقدار ۱ گرم از آن را وزن کردیم. سپس همراه با ۶ میلی لیتر متانول، عصاره آن توسط دستگاه سونیکتت (ارتعاش صوتی) جداسازی گردید. پس از

ضد التهابی و ضد دردی در مدل های حیوانی از خود نشان داده اند (Hosseinzadeh, 2002). فرآورده تجارتي آن شامل، کلاله و ناحیه انتهایی خامه گل است. از زعفران در طب سنتی به عنوان گیاه شادی آور یاد می شود (میر حیدر، ۱۳۷۲؛ زرگری، ۱۳۶۹). امروزه در حدود ۲۱ درصد افراد کشورهای در حال توسعه در طول زندگی خود به افسردگی مبتلا می شوند، که یکی از مواد طبیعی قابل توصیه برای درمان آن، می توان به زعفران اشاره کرد (Cryan et al., 2002).

میزان تولید زعفران در کل جهان در سال ۱۹۹۹-۱۹۹۸، ۱۴۰ تن بوده که ۱۲۰ تن آن متعلق به کشور ایران می باشد (قاسمی، ۱۳۸۸). زعفران از گیاهان مهم استان خراسان بوده که شهرستان های این استان درصد اعظم زعفران دنیا را تأمین می نماید. زعفران دارای تعدادی ترکیب ثانویه مهم می باشد که برای آن خواص بیولوژیکی فراوان ذکر کرده اند. یکی از این ترکیبها کروسین (Crocic) است. کروسین، ترکیبی کارتنوئیدی و قابل حل در آب که عامل رنگ زعفران است این ترکیب پیش ساز ویتامین A نبوده بنابراین تجویز آن در دوزهای بالا، بسیار کمتر از مشتقات ویتامین A سمی می باشد. زعفران علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلول های لوسمی انسان و دیگر مدل های سرطانی عملکرد خوبی داشته است و باعث بهبودی در گردش خون، درمان بیماری های قلبی و عروقی، درمان کوفتگی و ضرب دیدگی ها، هیپاتیت، افزایش بیگانه خواری ماکروفاژ و افزایش ایمنی بدن می شود. حساسیت نسبت به این ماده فوق العاده نادر گزارش شده است (Nair et al. 1995; Abdullaev, 2002; Tarantilis et al., 1994).

کروسین ترکیبی گلیکوزیدی است که دارای دو ملکول جنتیوبیوز می باشد (فاطمی، ۱۳۸۰). کروسین در اثر اکسیداسیون نوعی کارتنوئید به نام پروتوکروسین به وجود می آورد که ماده ای رنگی است و در اثر هیدرولیز به کروسین تبدیل می شود (مؤمنی، ۱۳۷۹). علاوه بر کروسین، زعفران حاوی آگلیکون کروسین به صورت آزاد و مقادیر کمی رنگدانه آنتوسیانین می باشد (صدقت، ۱۳۷۹). کروسین در اثر جدا کردن دو ملکول قند جنتیوبیوز از کروسین به دست می آید که ساختمان کلی آن همچون رشته آلیفاتیک کاروتن ها می باشد (فاطمی، ۱۳۸۰).

از کروسین به ویژه کروسین ۱ که سبب جلوگیری از رشد تومورها می شود و میزان انتشار اکسیژن به مویرگ های سلول های آندوتلیوم و بافت های دیگر را افزایش می دهند استفاده زیادی می نمایند. کروسین ها یا با نابود کردن سلول های سرطانی و یا به تعویق انداختن شروع حالت سرطان زدایی تومورها، سبب کنترل تومورها می گردند. همچنین کروسین یک ماده با خاصیت ضد سکتی ای (anti-apoptotic) می باشد. با شروع مطالعات در زمینه کشت بافت سلول های جانوری مشخص شد که در محیط لوله آزمایش (*In-vitro*) کروسین قادر است از تخریب سلول های

آماده سازی نمونه جهت شناسایی و بررسی میزان ترکیب کروسین، آن را به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تزریق نمودیم.

۲-۲. شرایط دستگاهی HPLC برای تعیین میزان ترکیب Crocin

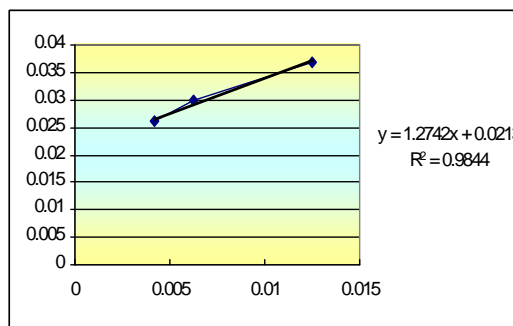
دستگاه کروماتوگرافی از شرکت Knuer، مدل Well Chrom 2000، پمپ Maxi-star K-1000 و دتکتور Spectrophotometer K-2500 می باشد. این دستگاه در ۴۴۰ نانومتر تنظیم گردیده است. ستون مورد استفاده Erospher 100 C₁₈ به طول ۲۵ سانتی متر و قطر ۴ میلی متر و فاز متحرک اتیل استات، ایزوپروپانل و آب (۵۶ : ۳۴ : ۱۰) با شدت جریان ۰/۶ میلی لیتر در دقیقه است، مقدار ۲۰ میکرومیلی لیتر از نمونه به مدت ۴۰ دقیقه به دستگاه تزریق گردید.

۲-۳. تهیه محلول استاندارد

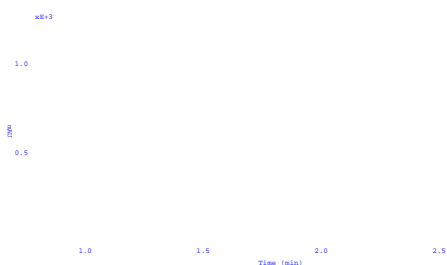
جهت تهیه منحنی استاندارد ترکیب Crocin (C₄₄H₆₄O₂₄) از شرکت Fluka خریداری گردید. نمونه استاندارد با متانول در سه رقت مختلف (۰/۲۴، ۰/۴۸ و ۰/۷۲ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه گردیده است.

۲-۴. رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد

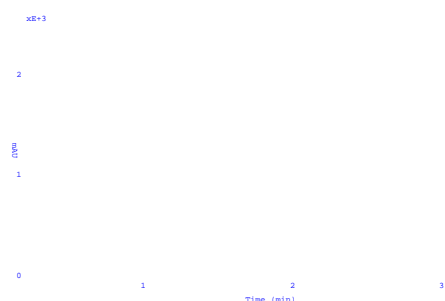
منحنی استاندارد توسط غلظت‌های متفاوت از نمونه کروسین (سه نمونه با غلظت های ۰/۲۴، ۰/۴۸ و ۰/۷۲ میلی گرم در میلی لیتر) و با تزریق به دستگاه تهیه می گردد. سپس سطح زیر طیف ماده مجهول با انطباق آن با نمودار کالیبراسیون، غلظت ماده مجهول بدست می آید.



شکل-۲. رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد



شکل-۳. کروماتوگرام نمونه زعفران تربت حیدریه



شکل-۴. کروماتوگرام استاندارد ترکیب کروسین با غلظت ۱/۱۴۴ میلی گرم در میلی لیتر

۳. نتایج و بحث

نتایج این تحقیق تأثیر شرایط نگهداری کلاله زعفران (*Crocus sativus* L.) را بر میزان ترکیب Crocin در نمونه های جمع آوری شده از شهرستان های کرج و خمین در آذر سال ۱۳۸۵ جمع آوری و تحت شرایط مختلف به مدت ۲۰ ماه در شرایط نور، محیط تاریک و در یخچال روی صفر درجه قرار دادیم و نمونه ها را در مرداد ۱۳۸۷ جهت اندازه گیری میزان ترکیب crocin با دستگاه HPLC مورد بررسی قرار دادیم. در این تحقیق میزان ترکیب crocin در شرایط مختلف از شهرستان کرج، به ترتیب در معرض نور ۰/۲۹ درصد، در محیط تاریک ۰/۴۱ درصد و در یخچال صفر درجه ۰/۳۰ درصد بدست آمد و شهرستان خمین، در معرض نور ۰/۳۰ درصد، در محیط تاریک ۰/۳۰ درصد و در یخچال صفر درجه ۰/۲۸ درصد بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده، بهترین شرایط نگهداری کلاله خشک در محیط تاریک می باشد.

جدول ۱- تأثیر شرایط نگهداری بر میزان ترکیب کروسین

نام شهر	شرایط نگهداری	میزان ترکیب کروسین	میزان (ppm)
کرج	۲۰ ماه در معرض نور	۰/۰۲۹ درصد	۲۹۰
کرج	۲۰ ماه در یخچال صفر درجه	۰/۰۳۰ درصد	۳۰۰
کرج	۲۰ ماه در محیط تاریک	۰/۰۴۱ درصد	۴۱۰
خمین	۲۰ ماه در معرض نور	۰/۰۳۰ درصد	۳۰۰
خمین	۲۰ ماه در یخچال صفر درجه	۰/۰۲۸ درصد	۲۸۰
خمین	۲۰ ماه در محیط تاریک	۰/۰۳۰ درصد	۳۰۰

در منطقه تربت حیدریه جمع آوری 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 (جایمند و هم‌کاران ۱۳۸۶).

در این تحقیق میزان ترکیب crocin در شرایط مختلف از شهرستان کرج، به ترتیب در معرض نور ۰/۰۲۹ درصد، در محیط تاریک ۰/۰۴۱ درصد و در یخچال صفر درجه ۰/۰۳۰ درصد بدست آمد و شهرستان خمین، در معرض نور ۰/۰۳۰ درصد، در محیط تاریک ۰/۰۳۰ درصد و در یخچال صفر درجه ۰/۰۲۸ درصد بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده، بهترین شرایط نگهداری کلاله خشک در محیط تاریک می باشد.

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

بنابراین همان طور که از نتایج مشاهده می شود مقدار رنگدانه های کروسین در نمونه های کلاله خشک شده در تاریکی بیشتر از دو نمونه دیگر است. در تحقیقی راینا و هم‌کاران (Raina et al., 1996) انجام دادند، نمونه های زعفران را در دمای ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد خشک نموده و سپس نتایج نشان داد که مقادیر رنگدانه های کروسین بیشتری از نمونه خشک شده در سایه بود. این محقق طولانی بودن زمان خشک شدن برای کلاله زعفران، در روش سایه را عامل ادامه یافتن فعالیت های آنزیمی و غیر آنزیمی و در نتیجه کاهش قابل توجه مقادیر رنگدانه های کروسین دانسته اند. تحقیقات همتی کاخکی (۱۳۷۰)، حسینی (۱۳۷۶) و عاطفی (۱۳۷۸) نیز همین نتیجه را برای زعفران نشان داده اند. در این تحقیق نیز نمونه های کلاله زعفران به مدت ۲۰ ماه، در شرایط 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 می باشد.

کروسین و رنگدانه های کروسین محلول در آب زعفران کارتنویدهایی با واحدهای قندی هستند که به راحتی در مجاورت رطوبت تحت اثر عواملی نظیر حرارت، اکسیژن و نور تغییر ماهیت می دهند. هم چنین جدا شدن بخش های قندی (توسط آنزیم بتا-گلوکوزیداز) با کاهش در حالت منجمد و در فشار پایین، فعالیت های آنزیمی و غیر آنزیمی تا حد زیادی کاهش می یابد. در سایر روش های خشک کردن حرارتی و یا سنتی بسته به شرایط بکار رفته تغییرات حاصل از فعالیت های آنزیمی و غیر آنزیمی بیشتر رخ می دهند.

در تحقیقی که جایمند و هم‌کاران (۱۳۸۶) داشتند، تأثیر شرایط نگهداری کلاله زعفران بر میزان ترکیب کروسین زعفران مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها در آذر سال ۱۳۸۲ از مزرعه ای

۴. منابع

- 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 Res*, 14: 1913-1918.
- حسینی، ع. ۱۳۷۶. فرآوری زعفران. موسسه کشاورزی و خدمات زعفران کاری زرگل، ص ۲۲ - ۵.
- جایمند، ک. رضایی، م. ب. و نجفی آشتینانی، ا. ۱۳۸۶. تأثیر مدت زمان نگهداری کلالة زعفران *Crocus sativus* L. بر میزان ترکیب crocin، فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۳(۲): ۲۶۸-۲۶۲.
- 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، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی.
- فاطمی، ح. ۱۳۸۰. شیمی مواد غذایی. شرکت سهامی انتشار، ۴۸۰ صفحه.
- مؤمنی، ت. ۱۳۷۹. عصاره های گیاهی، شهید فرهاد رضا. ۱۴۸ صفحه.
- میرحیدر، ح. ۱۳۷۲. معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری ها. دفتر نشر فرهنگ اسلامی تهران. جلد دوم، ۵۳۵ صفحه.
- همتی کاخکی، ع. ۱۳۷۰. بررسی تأثیر روش های مختلف خشکانیدن در کیفیت زعفران. گزارش طرح پژوهشی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده خراسان. ص ۳۹-۵.
- Abdullaev, F. I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Expet Bio Med*, 227: 20-25.
- Cryan, G. F., Markou, A. and Lucki, I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, 23: 238-45 .
- Hosseinzadeh, H. and Younesi, H. 2002. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol*. 2: 1-8.
- 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. and Gaur, G. S. 1996. Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. *J. Sci Food Agric*, 71: 27-32.