Saffron Agronomy & Technology
Vol. 4, No. 3, Fall 2016, P. 225-237
DOI: 10.22048/jsat.2016.38674

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵ ص. ۲۳۷-۲۲۵

استخراج و تعیین کروسین در نمونه‌های زعفران با استفاده از میکرواستخراج مایع–مایع پخشی

سمیه حیدری[۱*] و مریم خلیلی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۱ خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۲۲ بهمن ۱۳۹۴

چکیده

اصلی‌ترین عامل ایجاد قدرت رنگی در زعفران ترکیبی به نام کروسین به فرمول شیمیایی $C_{44}H_{64}O_{24}$ است. کروسین یکی از چند کاروتنویید محدود موجود در طبیعت است که به‌آسانی در آب حل می‌شود. این حلالیت یکی از دلایل کاربرد وسیع آن به‌عنوان رنگ دهنده در مواد غذایی و دارویی نسبت به سایر کاروتنوییدها می‌باشد. قدرت رنگی زعفران یکی از پارامترهای عمده تعیین کننده کیفیت زعفران می‌باشد که با اندازه‌گیری میزان کروسین موجود در آن مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. روش میکرو استخراج مورد استفاده در این تحقیق از جدیدترین و ساده‌ترین روش‌های میکرو استخراج است که می‌تواند با موفقیت برای پیش تغلیظ و جداسازی کروسین در نمونه زعفران بکار رود. سرعت، ارزانی و آنالیز آسان در طیف سنجی UV-Vis مورد استفاده در اندازه‌گیری کروسین نسبت به سایر روش‌های اندازه‌گیری، از مزایای این روش است. بررسی‌ها نشان‌داد که نوع و حجم حلال پخشی و حلال استخراج در بازده استخراج تأثیر بسزایی دارد. در این پژوهش از استون به عنوان حلال پخشی و دی‌کلرومتان به عنوان حلال استخراج استفاده شد. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون در دامنه ۰/۰۰۰۰۱–۰/۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر خطی بوده و حد تشخیص روش ۰/۰۰۰۰۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. روش پیشنهادی تحت شرایط بهینه برای اندازه‌گیری کروسین نمونه‌های زعفران مناطق مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و درصد بازیابی بسیار خوبی با خطای کم محاسبه شده است.

کلمات کلیدی: پیش تغلیظ، میکرواستخراج، اسپکتروفتومتری، کروسین.

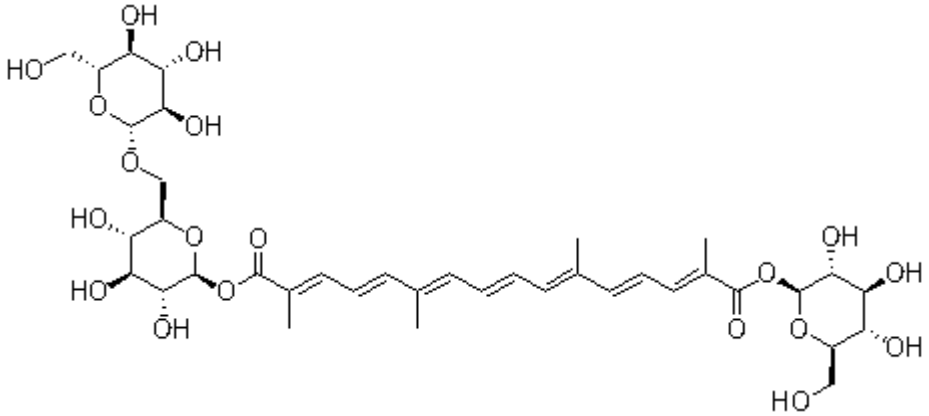
مقدمه

زعفران گیاهی دائمی، علفی و زینتی است که به گل سلامتی و آرامش‌بخش و شادی‌آور معروف است و به آن القابی نظیر سلطان و پادشاه ادویه‌ها و طلای سرخ نسبت داده‌اند. این گیاه چاشنی بسیار گران‌بهایی است که از کلاله‌های خشک گل *Crocus sativus* بدست می‌آید. عامل اصلی ایجاد قدرت رنگی کلاله‌های زعفران ترکیبی زرد رنگ بنام کروسین است. کروسین‌ها استرهای گلیکوزیل کروستین هستند که یک واحد مرکزی با هفت پیوند دوگانه‌ی مزدوج و چهار گروه متیل به‌عنوان زنجیره‌ی جانبی را در بر می‌گیرند. در ضمن این ترکیب ها از جمله معدود خانواده‌های کارتنوییدهایی هستند که به مقدار زیادی در آب حل می‌شوند. کروسین معمولی دارای فرمول

۱– استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربت جام و مدرس گروه گیاهان دارویی، دانشگاه تربت حیدریه.
۲– دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، گروه گیاهان دارویی، دانشگاه تربت حیدریه.

(*– نویسنده مسئول: s.heydari@tjamcaas.ac.ir)

مولکولی ($C_{44}H_{64}O_{24}$) است. این ترکیب یک دی‌استرژنتیوبیوزید از کروستین با فرمول مولکولی ($C_{20}H_{24}O_4$) است. گروه‌های انتهایی با یک، دو یا سه گروه گلوکوز استری شده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار کروسین
Figure 1- Structure of Crocin.

کروسین یکی از چند کاروتنویید محدود موجود در طبیعت است که به آسانی در آب حل می‌شود. این حلالیت یکی از دلایل کاربرد وسیع آن به عنوان رنگ‌دهنده در مواد غذایی و دارویی نسبت به سایر کاروتنوییدها می‌باشد. این کاروتنوئید آب-دوست در زعفران نسبت به دیگر کاروتنوئیدها بیشتر بوده و فعالیت ضدسرطانی وسیعی از خود نشان می‌دهد (Abdullaev, 2002; Hosseinzadeh et al., 2009). قدرت رنگی زعفران یکی از پارامترهای عمده تعیین‌کننده کیفیّت زعفران می‌باشد که با اندازه‌گیری میزان کروسین موجود در آن مورد ارزیابی قرار می-گیرد. بنابراین ارائه یک روش ساده و سریع برای اندازه‌گیری کروسین از اهمیت زیادی برخوردار است.

با وجود پیشرفت در زمینه تجهیزات تجزیه‌ای، تأمین یک نمونه استخراج شده مناسب برای تعیین مقدار دستگاهی لازم می‌باشد. زیرا بیشتر تجهیزات دستگاهی قادر نیستند بافت پیچیده نمونه را به طور مستقیم تحمل کرده و باید مرحله آماده-سازی نمونه قبل از اندازه‌گیری به وسیله این دستگاه‌ها انجام شود. انتخاب یک روش استخراج مناسب نیازمند توجه به پارامترهایی نظیر بازده استخراج، زمان استخراج، در دسترس بودن و قیمت تجهیزات، پیچیدگی روش، مقدار حلال مصرفی و محدوده کاربرد پذیری آن روش می‌باشد. بنابراین دانشمندان همچنان به دنبال تحقیق برای به دست آوردن روش‌های آماده-سازی نمونه با سرعت بیشتر، سهولت بیشتر، هزینه اجرایی کمتر و تأمین صحت و دقت لازم با یک حد تشخیص قابل قبول هستند. مرحله آماده‌سازی نمونه که اولین مرحله مهم در یک آنالیز شیمیایی است شامل خالص سازی آنالیت از بافت پیچیده نمونه و پیش‌تغلیظ می‌باشد که معمولاً گران‌قیمت و وقت-گیرترین مرحله در طی یک فرایند آنالیز به شمار می‌رود. فرایندهای آماده‌سازی نمونه مانند استخراج، غنی‌سازی و جداسازی آنالیت‌ها قابلیت اطمینان و صحت آنالیزها را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ahmed, 2001). استخراج مایع مایع[1] (LLE) بر پایه‌ی انتقال آنالیت‌ها از یک نمونه‌ی آبی به یک حلال غیرقابل امتزاج با آب به‌طور گسترده‌ای برای آماده‌سازی نمونه به‌کار گرفته شده است. با این وجود برخی از کاستی‌ها

1- Liquid-Liquid extraction

مثل تشکیل امولسیون، استفاده از حجم زیاد نمونه و حلال‌های آلی سمی، روش LLE را روشی زمان‌بر، گران و ناسازگار با محیط زیست می‌سازد. امروزه تلاش‌ها برای توسعه‌ی روش-هایی است که در وقت و مواد و نیروی کار صرفه‌جویی می‌کنند. از این نظر روند فعلی به سوی ساده‌سازی، کوچک‌سازی، خودکار شدن و همچنین استفاده از روش‌های بدون حلال، دوست‌دار محیط زیست و دارای بازده قابل قبول استخراج پیش می‌رود. طی سال‌های گذشته بعضی از روش‌های جدید کوچک‌سازی - شده‌ی استخراج به عنوان جایگزین برای روش‌های معمول مورد بررسی قرار گرفته‌اند که می‌توان از این میان به میکرواستخراج فاز مایع[1] (LPME) اشاره کرد. میکرواستخراج فاز مایع روش آماده‌سازی نمونه با کاهش حجم حلال نسبت به روش استخراج مایع – مایع است که در آن فقط چند میکرولیتر از حلال برای پیش‌تغلیظ آنالیت از نمونه‌های مختلف مورد نیاز است (Ma & Cantwell, 1999; Kocurova et al., 2013; Zgota et al., 2011). در حالی که در روش استخراج مایع – مایع قدیمی بیش از صد میلی لیتر حلال مورد نیاز بود.

روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی[2] یکی از روش‌های میکرواستخراج بوده که در سال ۲۰۰۶ معرفی شد (Rezaee et al., 2006). در این روش چند میکرولیتر از یک حلال آلی غیر قابل امتزاج با آب (حلال استخراج‌کننده) در یک حلال آلی (حلال پخشی) که قابل امتزاج با هر دو فاز آبی و آلی می‌باشد حل می‌شود و سپس توسط یک میکروسرنگ با سرعت به محلول آبی نمونه تزریق می‌شود. بلافاصله محلول ابری تشکیل می‌شود که این حالت ناشی از ذرات بسیار ریز حلال استخراجی می‌باشد که به حالت کلوئیدی در سرتاسر محلول نمونه پخش می‌شوند. بعد از عمل سانتریفیوژ محلول ابری شکل فاز آلی ته-نشین شده و از فاز آبی جدا می‌شود. پس از آن فاز ته‌نشین که حاوی آنالیت است به دستگاه‌های تجزیه‌ای منتقل می‌گردد (Ghaedi et al., 2009; Dadfarnia et al., 2008; Dadfarnia et al., 2009; Khalili Zanjani et al., 2007; Xiaodong et al., 2011). در روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی به دلیل تشکیل حالت ابری، مساحت سطح تماس بین حلال استخراج و فازآبی بسیار زیاد می‌باشد، بنابراین بلافاصله تعادل بین دو فاز برقرار می‌شود و موجب انتقال سریع گونه‌های مورد نظر از فاز آبی به درون حلال استخراجی می‌شود، که در حقیقت مزیت اصلی این روش می‌باشد. از دیگر مزایایی این روش می‌توان به سادگی، سرعت، کم‌هزینه‌بودن روش و استفاده از حجم کم نمونه اشاره کرد. از آنجا که در این روش از مقادیر کم حلال آلی (بسته به قابلیت انحلال حلال آلی در آب) استفاده شده و گونه مورد نظر بدرون این حجم کم استخراج می‌شود، پس حساسیت روش بالا بوده و به عنوان یک روش با پیش تغلیظ بالا شناخته شده است (Biparva et al., 2012). حلال استخراجی در روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی از عواملی است که نقش مهمی در رسیدن به بازیابی، فاکتور تغلیظ و گزینش خوب نمونه‌های مورد آنالیز ایفا می‌کند. این حلال باید امتزاج پذیری کمی با فاز آبی (محلول نمونه) داشته باشد و تشکیل یک سیستم دوفازی (محلول کلوئیدی با قطرات بسیار ریز) پایدار در حضور حلال پخشی، در هنگام تزریق به محلول آبی را بدهد. همچنین باید پتانسیل استخراج آنالیت را دارا بوده، امتزاج پذیری با حلال پخشی داشته باشد و در ناحیه طول موج جذب آنالیت هیچ جذبی نداشته باشد. حلال پخشی در این روش باید با هر دو فاز آلی (حلال استخراج کننده) و فاز آبی (محلول نمونه) امتزاج پذیر باشد. همچنین باید بتواند کشش سطحی حلال استخراج کننده را کم و آن را به صورت قطرات ریز در فاز آبی پراکنده کند تا سطح بیشتری برای تماس حلال استخراج کننده و محلول نمونه فراهم کند و بدین ترتیب انتقال ترکیبات هدف از فاز آبی به فاز آلی افزایش یابد. سمیت و قیمت نیز از

1– Liquid Phase Microextraction(LPME)

2– Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

فاکتورهای مورد نظر در انتخاب حلال پخشی مناسب می‌باشد.

در حال حاضر اندازه‌گیری کروسین با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مطابق با استاندارد ملی ۲-۲۵۲ انجام می‌شود (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۵). متأسفانه این روش ویژه نبوده و قادر به تشخیص نمونه‌ی مورد نظر با حساسیت بالا و خطای کم نمی‌باشد و نمی‌توان از این روش برای اندازه‌گیری کروسین در نمونه‌های بیولوژیکی استفاده کرد (Lozano et al., 1999; Zougagh et al., 2005a). روش‌های مختلفی برای تعیین کروسین در نمونه‌های زعفران استفاده شده است که می‌توان به کروماتوگرافی لایه نازک (Sampathu et al., 1984)، کروماتوگرافی مایع (Caballero-Ortega et al., 2007; Mounira Lage et al., 2009)، کروماتوگرافی گازی (Narasimhan et al., 1992; Tarantilis & Polissiou, 1997)، طیف سنجی جرمی (Tarantilis et al., 1995)، طیف سنجی مادون قرمز (Zalacain et al., 2005)، الکتروفورز (Zougagh et al., 2005b) و رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (Assimiadis et al., 1998; Tarantilis & Polissiou., 2004) اشاره کرد.

در این بررسی از روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی که روشی نوین برای آماده‌سازی نمونه است (Dadfarnia et al., 2010) به منظور دست یافتن به بازدهی بالا در جداسازی کروسین در نمونه‌های زعفران و نمونه بیولوژیکی شیر و اندازه-گیری آن در غلظت‌های کم با طیف سنجی ماورابنفش- مرئی در طول موج ۴۴۰ نانومتر با صرف زمان و هزینه کمتر نسبت به سایر روش‌های موجود استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

استانداردها و واکنشگرها

کلیه حلال‌ها و معرف‌های شیمیایی به کار رفته در این پژوهش، فرآورده شرکت مرک آلمان و بدون آماده‌سازی بعدی به کار گرفته شدند. با حل کردن مقدار مناسب کروسین در آب مقطر دو بار تقطیر، محلول استاندارد با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تهیه گردید و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد به دور از نور نگهداری شد. از رقیق کردن محلول مادر، محلول‌های روزانه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شدند. حلال‌های تتراکلریدکربن، دی کلرواتان، ارتو-زایلن، دی کلرومتان و کلروفرم به عنوان حلال استخراج و حلال‌های اتانول، متانول، استونیتریل و استون به عنوان حلال پخشی از شرکت مرک خریداری و مورد استفاده قرار گرفتند. این حلال‌ها ویژگی‌های مورد نیاز برای حلال استخراج و حلال پخشی که در بخش مقدمه گفته شد را دارا هستند. محلول‌های NaOH و HCl برای تنظیم pH با حل کردن مقادیر مناسب این دو ماده در آب دو بار تقطیر تهیه شدند. کلاله زعفران خشک مربوط به تربت حیدریه، قائنات و باخرز در استان خراسان خریداری شدند.

دستگاه‌ها و ابزار

برای اندازه‌گیری میزان جذب محلول‌ها از یک اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6300) مجهز به میکروسل کوارتز که حداقل جذب را دارد، استفاده شد. برای برداشتن نمونه پیش‌تغلیظ شده و تزریق به میکروسل دستگاه اسپکتروفتومتر، از یک میکروسرنگ ۱۰ میکرولیتری هامیلتون استفاده گردید. مقادیرpH با استفاده از pH متر (مدل NANO Technic) اندازه-گیری شد. برای توزین از یک ترازوی تجزیه‌ای سارتوریوس ساخت کشور آلمان استفاده گردید. جداسازی فاز استخراج با استفاده از سانتریفیوژ انجام شد.

اصول استخراج کروسین به روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

پس از تعیین شرایط بهینه که در بخش بعد به آن پرداخته می‌شود به منظور استخراج کروسین توسط روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، ۲۰۰ میکرولیتر از دی کلرومتان به عنوان فاز

استخراج و ۴۰۰ میکرولیتر از استن به عنوان فاز پخشی بطور کامل در بشر کوچکی بهم زده می‌شود. مجموع دو ترکیب با سرنگی، سریعاً به نمونه حاوی آنالیت تزریق می‌گردد. پس از تشکیل محلول ابری شکل استخراج انجام می‌شود. هم زمان چهار لوله آزمایش برای بررسی شرایط بهینه استخراج مورد استفاده قرار می‌گیرد که سه تا از لوله‌ها حاوی نمونه و لوله چهارم حاوی آب مقطر است. کلیه عملیات روی محتوای هر چهار لوله آزمایش صورت می‌گیرد. محتوای استخراجی لوله آزمایش چهارم به‌عنوان شاهد در تعیین جذب آنالیت مدنظر است. بعد از تشکیل حالت ابری، نمونه‌ها به مدت شش دقیقه با سرعت ۴۰۰۰-۳۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد از انجام سانتریفیوژ، درهر چهار لوله آزمایشی دو فاز مشاهده می‌شود. فاز بالای لوله‌های آزمایش را جدا کرده و فاز ته نشین شده پایین با دقت و تماماً با استفاد از میکروسرنگ وارد سل کوارتز می‌شود. قبل از اندازه‌گیری جذب آنالیت، دستگاه طیف‌سنج کالیبره شده و در حضور محتوای استخراج لوله آزمایش چهارم به عنوان شاهد، جذب آنالیت در طول موج ۴۴۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. این اندازه‌گیری برای هر سه لوله آزمایشی انجام شده و نتایج گزارش می‌گردد.

فاکتور پیش‌تغلیظ Enrichment Factor (EF) به صورت نسب غلظت آنالیت در فاز ته‌نشین شده C_{sed} به غلظت اولیه آنالیت در نمونه‌ی آبی تعریف می‌شود.

$$EF=\frac{C_{sed}}{C_0} \quad (۱)$$

که مقدار C_{sed} از منحنی کالیبراسیون بدست می‌آید.

بازیابی استخراج Extraction Recovery (ER) بصورت درصدی از کل آنالیت (no) که در فاز ته‌نشین شده استخراج می‌شود (n_{sed}) تعریف می‌شود.

$$ER=\frac{n_{sed}}{n_0}\times 100=\frac{C_{sed}}{C_0}\times\frac{V_{sed}}{V_{aq}}\times 100 \quad (۲)$$

$$ER=\frac{V_{sed}}{V_{aq}}\times EF\times 100 \quad (۳)$$

که V_{sed} و V_{aq} به ترتیب حجم فاز ته نشین و حجم محلول آبی هستند.

نتایج و بحث

در روش میکرو استخراج مایع – مایع پخشی سه جزء حلال آبی، حلال آلی و حلال پاشنده به گونه‌ای با هم مخلوط می‌شوند که حلال آلی استخراج‌کننده بصورت قطرات ریز در بین لایه‌های حلال آبی پخش شود. عوامل تجربی متعددی با هدف بهبود سرعت، حساسیت، انتخابگری و بازده این روش مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

اثر نوع حلال استخراج کننده و حلال پخشی

در این پژوهش کلرفرم، دی‌کلرومتان، ارتو-زایلن، دی‌کلرو-اتان و تتراکلریدکربن به‌عنوان حلال استخراج‌کننده و اتانول، متانول، استونیتریل و استون به عنوان حلال پخشی مورد بررسی قرارگرفتند. نتایج نشان می‌دهد که در بین حلال‌های آزمایش شده بیشترین استخراج را حلال پخشی استون و حلال استخراج دی‌کلرومتان با بازده ۸۷/۸۶ درصد نشان می‌دهد (جدول ۱). شکل ۲ بیانگر اثر نوع حلال استخراج بر بازده استخراج کروسین با حلال پخشی استون می‌باشد. استون قابلیت حل شدن در هردو فاز را دارا است و یک حلال پخشی مناسب برای استخراج می‌باشد؛ بنابراین با توجه به بالاترین بازده استخراج، دی‌کلرو-متان نسبت به دیگر حلال‌های استخراج و استون نسبت به دیگر حلال‌های پخشی برای انجام آزمایش میکرواستخراج مایع–مایع پخشی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تمام مراحل آزمایش فاکتور پیش تغلیظ (EF) با توجه به نسبت جذب خوانده شده بعد از عمل استخراج به جذب خوانده شده قبل از عمل استخراج تعیین شده و بازده استخراج به روش زیر تعیین می‌شود.

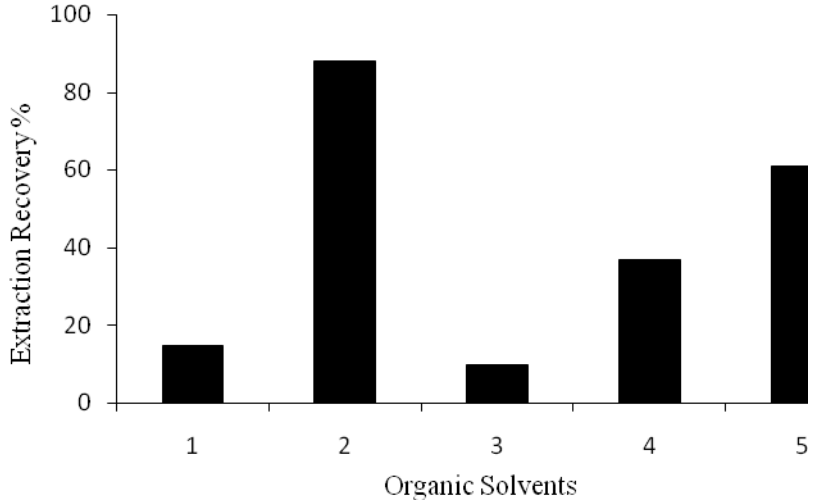
$$ER=\frac{V_{sed}}{V_{aq}}\times EF\times 100= \quad (۴)$$

$$0.1/10 \times 87.86 \times 100 = 87.86$$

جدول ۱- اثر نوع حلال پخشی و حلال استخراج بر بازده استخراج کروسین (۳ = تعداد تکرار)

Table 1- Effect of type of the disperser solvent and extraction solvent on the extraction recovery of crocin (n=3)

حلال Solvent	متانول Mthanol	استون Acetone	استونیتریل Acetonitrile	اتانول Ethanol
کلروفرم Chloroform	13.05±1.51	10.00±1.31	9.69±1.11	14.12±1.12
دی‌کلرومتان Dichloromethane	65.71±1.41	87.86±1.12	14.28±1.10	43.00±0.95
اورتو- زایلن Ortho-xylene	5.65±0.60	2.86±0.95	10.71±0.98	6.22±0.98
دی‌کلرواتان Dichloroethane	37.91±1.01	14.29±1.51	21.93±1.22	20.92±1.11
تتراکلریدکربن Tetrachloridcarbon	51.81±1.60	61.00±0.52	20.09±2.10	49.12±1.98



شکل ۲- اثر نوع حلال استخراج بر بازده استخراج کروسین (حلال پخشی استون)

Figure 2- Effect of type of extraction solvent on the extraction recovery of crocin (Acetone disperser solvent).

کلروفرم:۱ دی‌کلرومتان:۲ اورتو- زایلن:۳ دی‌کلرواتان:۴ تتراکلریدکربن:۵

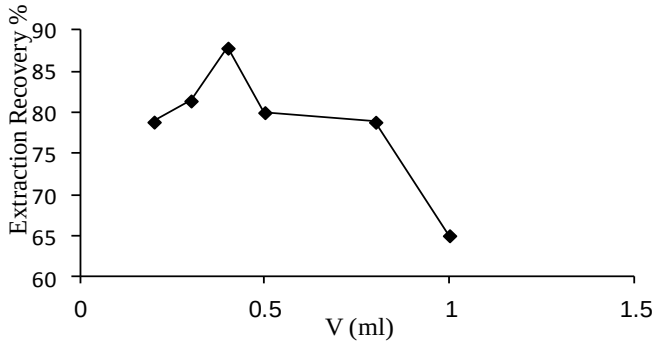
1: Chloroform 2: Dichloromethane 3: Ortho-xylene 4: Dichloroethane 5: Tetrachloridcarbon

اثر حجم حلال پخشی استون

به منظور بررسی اثر حجم حلال پخشی استون از دی‌کلرو-متان با حجم ۲۰۰ میکرولیتر به عنوان حلال استخراج استفاده می‌شود (جدول ۲). انتخاب حجم ۴۰۰ میکرولیتر از استون جهت استخراج کروسین از نمونه بیشترین بازده استخراج با مقدار ۸۷/۸۶ درصد را نشان می‌دهد (شکل ۳). توجه به اینکه هدف استفاده از حلال پخشی ایجاد سطح تماس به منظور انتقال آنالیت از محلول نمونه به فاز استخراج می‌باشد و در این حجم این سطح فراهم شده و با ادامه افزایش حجم استون بازده استخراج روند نزولی به خود می‌گیرد. زیرا با ادامه افزیش حجم استون، قابلیت انحلال کروسین در آب افزایش یافته و فرآیند استخراج به طور ناقص انجام می‌گیرد.

جدول ۲- اثر حجم استون بر بازده استخراج کروسین (۳ = تعداد تکرار)
Table 2-Effect of volume of aceton on the extraction recovery of crocin (n=3)

حجم استون (میلی لیتر) Volume of acetone (ml)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.8	1
بازده استخراج Extraction recovery (%)	78.86±1.20	81.43±1.32	87.86±1.35	80.01±1.30	78.84±1.30	65.02±1.09



شکل ۳- بهینه سازی حجم حلال پخشی استون
Figure 3- Optimization of volume of disperser solvent, aceton.

اثر حجم حلال استخراجی دی‌کلرومتان

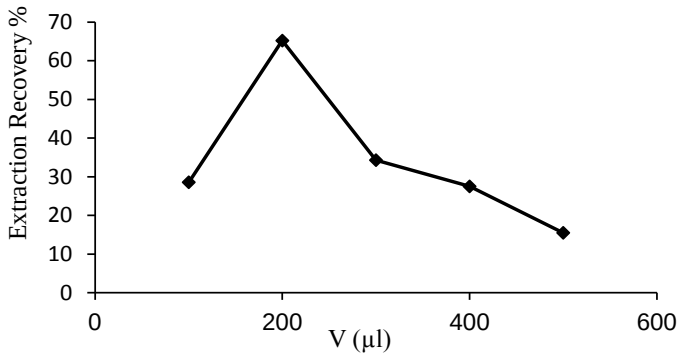
حجم حلال استخراجی دی‌کلرومتان بر روی استخراج کروسین تأثیر زیادی دارد. این اثر در شرایطی مطالعه شده که حجم حلال پخشی استون مورد استفاده ۴۰۰ میکرولیتر می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش حجم دی‌کلرومتان تا ۲۰۰ میکرولیتر بازده استخراج کروسین افزایش یافته و به ۶۵/۲۰ درصد می‌رسد (جدول ۳). پس از آن افزایش حجم دی‌کلرومتان باعث کاهش بازده می‌گردد؛ زیرا در حجم‌های بالاتر، ذرات فاز آلی (دی‌کلرومتان) افزایش یافته و در نتیجه نسبت بین دی-کلرومتان و اتانول زیاد شده و غلظت کروسین در فاز آلی کاهش یافته و بازده استخراج کم می‌شود (شکل ۴).

اثر pH بر بازده استخراج

همانند هر روش استخراج دیگری به منظور فراهم کردن انتخاب‌گری بهتر می‌توان pH نمونه را در روش میکرو استخراج مایع – مایع پخشی تنظیم کرد. برای این مطالعه pH محلول استاندارد از بازه‌ی ۱ تا ۱۲ با افزایش مقدار مناسب هیدروکلریک‌اسید یا سدیم‌هیدروکسید تنظیم می‌شود. این اثر در شرایطی مطالعه شده که حجم حلال پخشی استون ۴۰۰ میکرولیتر و حجم حلال استخراج دی‌کلرومتان ۲۰۰ میکرولیتر می‌باشد (جدول ۴). نتایج نشان می‌دهد که درpH برابر با ۹ بازده استخراج بیشترین مقدار خود را داشته و به ۵۹/۲۰ درصد می‌رسد (شکل ۵).

جدول ۳- اثر حجم دی کلرومتان بر بازده استخراج کروسین (۳ = تعداد تکرار)
Table 3- Effect of volume of dichloromethan on the extraction recovery of crocin (n=3)

حجم دی کلرومتان (میکرولیتر) Volume of dichloromethane (µ)	100	200	300	400	500
بازده استخراج Extraction recovery (%)	28.57±1.20	65.20±1.32	34.29±1.22	27.5±1.2	15.5±1.3



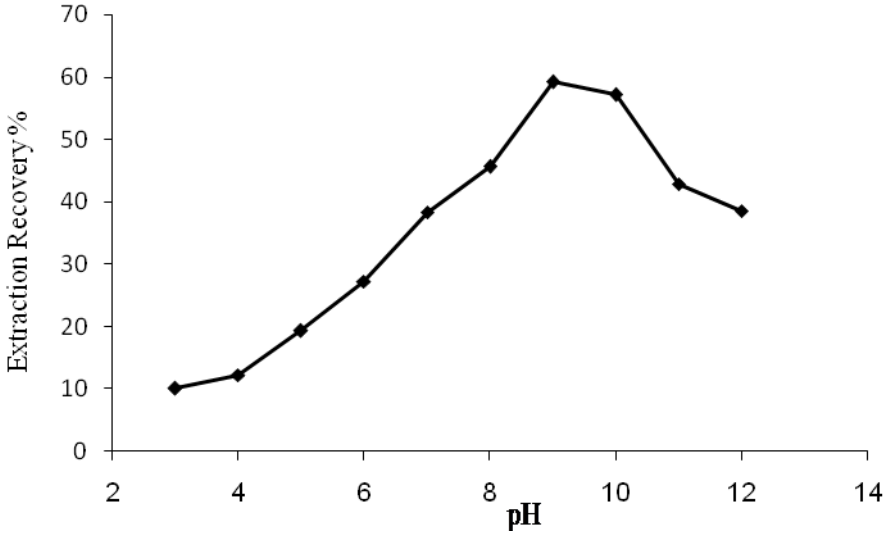
شکل ٤- بهینه سازی حجم حلال استخراج دی کلرومتان

Figure 4- Optimization of volume of extraction solvent, dichloromethane.

جدول ٤- اثر PH بر بازده استخراج کروسین (۳ = تعداد تکرار)

Table 4- Effect of pH on the extraction recovery of crocin (n=3)

شاخص واکنش pH	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
بازده استخراج Extraction recovery (%)	10.10±1.30	12.21±1.25	19.29±1.34	27.18±1.22	38.34±1.05
شاخص واکنش pH	8	9	10	11	12
بازده استخراج Extraction recovery (%)	45.60±۱/۲۶	59.20±1.50	57.14±1.07	42.86±1.17	38.56±1.25



شکل ٥- اثر pH بر بازده استخراج کروسین

Figure 5- Effect of pH on the extraction recovery of crocin.

اثر غلظت نمک (٪ قدرت یونی محیط) بر استخراج

قدرت یونی می‌تواند یکی از عوامل مؤثر بر بـازده اسـتخراج باشد که با توجه به نوع آنالیت در تکنیک میکرواستخراج مـایع- مایع پخشی اثر یکسانی ندارد. اثراتی که قدرت یونی محیط می-

تواند بر استخراج آنالیت داشته باشد عبارتند از: استخراج را بهبود بخشد، تأثیری بر استخراج نداشته باشد، بازدهی استخراج را کم کند. به منظور بررسی اثر قدرت یونی بر بازده استخراج، اثر غلظت NaCl در دامنه ۱ تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی در pH برابر با ۹ و ۴۰۰ میکرولیتر حلال پخشی استون و ۲۰۰ میکرولیتر حلال استخراج دی‌کلرومتان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که افزایش نمک بازده استخراج را کم می‌کند. بنابراین استخراج بدون افزایش نمک صورت می‌گیرد. با افزایش قدرت یونی محلول که به دلیل افزایش نمک صورت می‌گیرد، قابلیت حل شدن کروسین در حلال آلی کاهش یافته و بازده استخراج کم می‌شود.

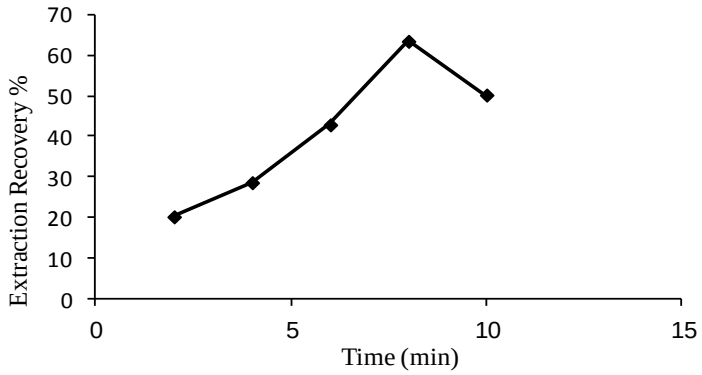
اثر زمان بر بازده استخراج

به منظور دست‌یابی به دقت، صحت و سرعت خوب، انتخاب یک زمان استخراج که دست‌یابی به تعادل کامل بین فاز آلی و آبی و حداکثر استخراج آنالیت‌ها را تضمین کند لازم است. در میکرو استخراج زمان استخراج به فاصله بین تزریق مخلوط استخراج‌کننده به محلول نمونه و سانتریفیوژ گفته می‌شود. نتایج بدست آمده از تعداد زیادی پژوهش نشان می‌دهد که در زمان بسیار کوتاه بعد از تشکیل حالت ابری استخراج سریعا به حالت تعادل می‌رسد. با توجه به اینکه در روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی با افزایش زمان سانتریفیوژ تا هشت دقیقه در pH برابر با ۹ و ۴۰۰ میکرولیتر حلال پخشی استون و ۲۰۰ میکرولیتر حلال استخراج دی‌کلرومتان بازده استخراج افزایش یافته و به ۶۳/۵۰ درصد می‌رسد، این پارامتر در این روش مورد بررسی قرار گرفته است (جدول ۵). نتایج نشان می‌دهد که با افزایش زمان سانتریفیوژ از هشت دقیقه به بعد به دلیل حل شدن کروسین در استون کاهش در بازده استخراج مشاهده می‌شود (شکل ۶).

جدول ۵- اثر زمان سانتریفیوژ بر بازده استخراج کروسین (۳ = تعداد تکرار)

Table 5- Effect of centrifuge time on the extraction recovery of crocin (n=3)

زمان (دقیقه) Time (min)	2	4	6	8	10
بازده استخراج Extraction recovery (%)	20.13±1.04	28.57±1.15	42.86±0.94	63.50±1.11	50.22±0.95



شکل ٦- اثر زمان سانتریفیوژ بر بازده استخراج کروسین

Figure 6- Effect of centrifuge time on the extraction recovery of crocin.

منحنی کالیبراسیون

پس از بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر بر استخراج کروسین، منحنی کالیبراسیون برای محلول‌های استاندارد کروسین در شرایط بهینه در pH برابر با ۹ و ۴۰۰ میکرولیتر حلال پخشی استون و ۲۰۰ میکرولیتر حلال استخراج دی‌کلرومتان و زمان سانتریفیوژ هشت دقیقه مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که نتایج نشان می‌دهد منحنی کالیبراسیون در دامنه ۰/۰۰۰۰۱– ۰/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر خطی است. معادله منحنی کالیبراسیون y = ۰/۷۸۸۸x + ۰/۳۰۱۵ بوده و ضریب همبستگی آن ۰/۹۹۲۱ است که y برابر با جذب و x غلظت محلول کروسین می‌باشد (جدول ۶). حد تشخیص روش که سه برابر انحراف استاندارد محلول شاهد تقسیم بر شیب منحنی کالیبراسیون است برابر با ۰/۰۰۰۰۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد که نشان دهنده حساسیت بالای روش در اندازه گیری کروسین می‌باشد.

جدول ٦- شاخص های تجزیه ای روش

Table 6- Figures of merit of the proposed method

محدوده خطی Linear range ($\mu g.mL^{-1}$)	**0.15–0.00001**
ضریب همبستگی Correlation of coefficient	0.9921
حد تشخیص Detection limit ($\mu g.mL^{-1}$)	0.000008
فاکتور پیش تغلیظ Preconcentration factor	88

اندازه‌گیری کروسین در نمونه‌های زعفران

به منظور بررسی کارآیی روش، از تکنیک مذبور جهت استخراج و اندازه‌گیری کروسین نمونه‌های زعفران استفاده شده است. کروسین عامل اصلی ایجاد قدرت رنگی کلاله‌های زعفران است. قدرت رنگی زعفران یکی از پارامترهای عمده تعیین کننده کیفیّت زعفران می‌باشد که با اندازه گیری میزان کروسین موجود در آن مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بنابراین اندازه-گیری مقدار کروسین زعفران از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ۰/۰۵گرم از نمونه خشک شده زعفران کاملاً ساییده شده در یک ارلن با ۷۰ میلی لیتر آب مخلوط و به مدت یک ساعت به شدت هم زده می‌شود. سپس به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود. ۱۰ میلی لیتر از این محلول برداشته و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود. سپس غلظت مشخصی از کروسین به نمونه‌های زعفران تربت حیدریه، قائنات و باخرز آماده شده اضافه و pH محلول زعفران به ۹ رسانده شده است. داخل هرلوله آزمایش۱۰ میلی لیتر از نمونه‌های زعفران ریخته شده و استخراج و اندازه-گیری در شرایط بهینه انجام می‌شود. همین روش برای اندازه-گیری کروسین در نمونه‌های زعفران بدون اضافه کردن غلظت مشخصی از کروسین انجام می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که بازده استخراج بالا بوده و روش از کارآیی خوبی برای استخراج و اندازه‌گیری کروسین در نمونه‌های زعفران برخوردار است (جدول ۷).

اندازه‌گیری کروسین در نمونه‌ی حقیقی شیر

از تکنیک میکرواستخراج مایع– مایع پخشی در شرایط بهینه جهت استخراج و اندازه‌گیری کروسین در نمونه بیولوژیکی شیر استفاده گردیده است. بدین ترتیب که به یک خانم شیرده ۲۸ ساله ۰/۵ میلی‌گرم زعفران داده شد و بعد از ۶ ساعت نمونه‌ی شیر جمع‌آوری گردید. برای تهیه نمونه، ۳ میلی لیتر از نمونه شیر برداشته شده و به آن استاندارد کروسین با غلظت مشخص تزریق و سپس با کمی آب رقیق سازی شده است. سپس مقداری متانول به آن اضافه وحدود ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده است. بدین ترتیب پروتئین‌ها رسوب می‌کنند. پس از آن با بافر هیدروکسید pH محلول روی ۹ تنظیم می‌شود. سپس تا ۵۰ میلی لیتر رقیق سازی شده و داخل هرلوله آزمایش۱۰ میلی لیتر

از نمونه شیر ریخته شده و استخراج و اندازه‌گیری با استفاده از تکنیک میکرواستخراج مایع- مایع پخشی در شرایط بهینه و روش افزایش استاندارد انجام می‌شود.

جدول ۷- نتایج تجزیه ای برای اندازه گیری کروسین در نمونه های زعفران
Table 7- Analytical results for determination of crocin in saffron samples

نمونه زعفران Saffron samples	غلظت کروسین تزریق شده در زعفران Spiked ($\mu g.mL^{-1}$)	غلظت کروسین به دست آمده Found ($\mu g.mL^{-1}$)	درصد خطا RSD (%)	بازدهی Recovery (%)
زعفران تربت حیدریه Saffron of Torbat-e-Heydarieh	-	0.25±0.05	3	-
زعفران تربت حیدریه Saffron of Torbat-e-Heydarieh	5×10^{-2}	0.31±0.07	3.2	98
زعفران قائنات Saffron of Ghaen	-	0.21±0.04	2.2	-
زعفران قائنات Saffron of Ghaen	5×10^{-2}	0.25±0.05	2.3	97
زعفران باخرز Saffron of Bakharz	-	0.19±0.04	2.1	-
زعفران باخرز Saffron of Bakharz	5×10^{-2}	0.25±0.06	3.1	97

همین روش برای اندازه‌گیری کروسین در نمونه شیر بدون اضافه کردن غلظت مشخصی از کروسین انجام می‌گیرد. نتایج نشان دهنده کارآیی بالای روش در محیط‌های حقیقی می‌باشد (جدول ۸). در صورتی که نمی‌توان از روش اسپکتروفتومتری مطابق با استاندارد ملی ۲-۲۵۲ برای اندازه‌گیری کروسین در محیط‌های حقیقی مثل شیر استفاده کرد. زیرا روش ویژه نبوده و قادر به تشخیص گونه مورد نظر با حساسیت بالا و خطای کم در محیط‌های پیچیده نمی‌باشد.

جدول ۸- نتایج تجزیه ای برای اندازه گیری کروسین در نمونه شیر
Table 8- Analytical results for determination of crocin in milk sample

نمونه حقیقی Biological sample	غلظت کروسین تزریق شده در شیر Spiked ($\mu g.mL^{-1}$)	غلظت کروسین به دست آمده Found ($\mu g.mL^{-1}$)	درصد خطا RSD (%)	بازدهی Recovery(%)
شیر Milk	-	4.02±0.04[a]	3	-
شیر Milk	5×10^{-2}	0.057±0.005	4.6	96

[a] ($ng.mL^{-1}$)

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که جداسازی و پیش‌تغلیظ کروسین در نمونه‌های آبی زعفران می‌تواند با استفاده از روش میکرواستخراج مایع -مایع پخشی انجام شده و بوسیله طیف‌سنج UV-Vis آنالیز گردد. روش میکرواستخراج مایع -مایع پخشی آسان و ارزان بوده و حساسیت بالا و حد تشخیص پایین

دارد. به‌منظور بدست آوردن بهترین بازده، باید عوامل مؤثر بر روش بهینه گردند. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون در دامنه ۰/۰۰۰۰۱–۰/۱۵میکروگرم بر میلی لیتر خطی بوده و حد تشخیص روش ۰/۰۰۰۰۰۸ میکروگرم بر میلی لیتر است. روش پیشنهادی تحت شرایط بهینه برای اندازه‌گیری کروسین نمونه‌های زعفران مناطق مختلف و نمونه بیولوژیکی شیر مورد استفاده قرار گرفته است و درصد بازیابی بسیار خوبی با خطای کم محاسبه شده است. در نتیجه روش قابلیت بالایی برای تعیین مقدار کروسین نمونه‌های حقیقی دارد.

منابع

Abdullaev, F. 2002. Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental Biology Medicine 227: 20-25.

Ahmed, F.E. 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. TrAC, Trends Analytical Chemistry 20: 649-661.

Assimiadis, M.K., Tarantilis, P.A., and Polissiou, M.G., 1998. UV-vis FT-Raman and 1H NMR spectroscopies of cis–trans carotenoids from saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Applied Spectroscopy 52: 519–522.

Biparva, P., Ehsani, M., and Hadjmohammadi, M.R. 2012. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. Food Composition and Analysis 27: 87–94.

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: 1126–1131.

Dadfarnia, S., Haji Shabani, A.M., and Kamranzadeh, E. 2009. Separation/preconcentration and determination of cadmium ions by solidification of floating organic drop microextraction and FI-AAS, Talanta 79: 1061-1065.

Dadfarnia, S., and Haji Shabani, A.M. 2010. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals, A review. Analytica Chimica Acta 658: 107-119.

Dadfarnia, S., Salmanzadeh, A.M., and Hajishabani, A.M. 2008. A novel separation/preconcentration system based on solidification of floating organic drop microextraction for determination of lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta 623: 163-167.

Ghaedi, M., Shokrollahi, A., Kianfar, A.H., Pourfarokhi, A., Khanjari, N., Mirsadeghi, A.S., and Soylak, M. 2009. Preconcentration and separation of trace amount of heavy metal ions on bis(2-hydroxy acetophenone) ethylendiimine loaded on activated carbon. Hazardous Materials 162: 1408–1414.

Hosseinzadeh, H., Modaghegh, M.H., and Saffari, Z. 2009. *Crocus sativus* L. (saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Evidence Based Complement Alternative Medicine 6: 343-50.

Khalili Zanjani, M.R., Yamini, Y., Shariati, S., and Jonsson J.A. 2007. A new liquid-phase microextraction method basedon solidification of floating organic drop. Analytica Chimica Acta 585 (2): 286-293.

Kocurova, L., Balogh, I.S., Sandrejova, J., and Andruch, V. 2013. Solvent microextraction: A review of recent efforts at automation. Microchemical Journal 110: 599-607.

Lozano, P., Castellar, M.R., Simancas, M.J., and Iborra, J.L. 1999. Quantitative highperformance

liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. Journal of Chromatography A 830: 477–483.

Ma, M., and Cantwell, F.F. 1999. Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: Preconcentration into a single microdrop. Analytical Chemistry 71: 388-393.

Mounira Lage, M., Charles, L., and Cantrell, C.L., 2007. 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.

Narasimhan, S., Chand, N., and Rajalakshmi, D. 1992. Saffron: quality evaluation by sensory profile and gas chromatography. Journal of Food Quality 15: 303–314.

Rezaei, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.R., Aghaee, E., Ahmadi, F., and Berijani. S. 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. Journal of Chromatography A 1116: 1-9.

Sampathu, S.R., Shivashankar, S., and Lewis, Y.S., 1984. Saffron (*Crocus sativus* L.): cultivation, processing, chemistry and standardization. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 20 (2): 123–157.

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

Tarantilis, P.A., and Polissiou, M.G. 1997. Isolation and identification of the aroma components from Saffron (*Crocus sativus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 459–462.

Tarantilis, P.A., and Polissiou, M.G. 2004. Chemical analysis and antitumor activity of natural and semi-natural carotenoids of saffron. Proceedings of the 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 2003. Acta Horticulturae 650: 447–461.

Xiaodong, W., Qiuling , Y., Zhidong, Y., and Qingwen, D. 2011. Ultra-sensitive determination of cadmium in rice and water by UV-vis spectrophotometry after single drop microextraction. Spectrochimica Acta 97: 249–254.

Zalacain, A., Ordoudi, S.A., Blazquez, I., Diaz-Plaza, E.M., Carmona, M., Blazquez, M.Z.I.,

Zgota- Grzeskowiak, A., and Grzeskowiak, T. 2011. Dispersive liquid-liquid microextraction. Trends Analytical Chemistry 30: 1382-1399.

Zougagh, M., Rios, A., and Valcarcel, M., 2005. An automated screening method for the fast, simple discrimination between natural and artificial colorants in commercial saffron products. Analytica Chimica Acta 535: 133–138.

Extraction and Determination of Crocin in Saffron Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

Somayeh Heydari[1] * and Maryam Khalili[2]

Received: 1 June, 2015 **Accepted:** 11 February, 2016

DOI:10.22048/jsat.2016.38674

Abstract

The main component responsible for color in saffron is crocin with the chemical formula of $C_{44}H_{64}O_{24}$. Crocin is one of several carotenoids in nature that is soluble in water. This solubility is one of the reasons for its widespread usage as a colorant in food and medicine compared to other carotenoids. The coloring strength of saffron is one of the major factors that determine the quality of the saffron stigma. It will be evaluated with measuring of crocin. Microextraction is the newest and easiest method that can be successfully applied for the preconcentration and separation of crocin in saffron samples. The advantages of this method are faster, cheaper and easier analysis by UV-Vis spectrophotometry in measurement of crocin compared to the chromatographic analysis methods. The studies showed that the type and volume of disperser and extractant solvent have a significant effect on the efficiency of crocin extraction. In this work, acetone as the disperser solvent and dichlorometane as the extractant solvent were found to be suitable combinations. Under the optimal conditions, the calibration curve was linear in the range of 0.15-0.00001 μg mL^{-1} and the limit of detection (LOD) was calculated based on 3 Sb/m (where, Sb and m are the standard deviation of the blank and slop ratio of the calibration curve respectively) was 0.000008 μg mL^{-1}. The procedure was applied to saffron samples and the good recovery percent for the saffron samples was obtained.

Keywords: preconcentration, microextraction, spectrophotometry, crocin

1- Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Torbat-e Jam and Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Torbat-e Heydariyeh.

2- M.Sc. Analytical Chemistry, Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Torbat-e Heydariyeh, Torbat-e Heydariyeh, Iran.

(*-Corresponding author E-mail: s.heydari@tjamcaas.ac.ir)