



## مقاله علمی - پژوهشی

# تغییر در کیفیت و اجزاء ترکیبات فرار زعفران تحت تأثیر زمان نگهداری در دو سال متوالی

جلال قنبری<sup>۱</sup> و غلامرضا خواجویی نژاد<sup>۲\*</sup>

تاریخ پذیرش: ۲۳ شهریور ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۲۷ خرداد ۱۳۹۹

قنبری، ج. و خواجویی نژاد، غ. ۱۴۰۰. تغییر در کیفیت و اجزاء ترکیبات فرار زعفران تحت تأثیر زمان نگهداری در دو سال متوالی. زراعت و فناوری زعفران، ۹(۱): ۲۹-۴۱.

## چکیده

تغییر در کیفیت زعفران در اثر زمان نگهداری بین نمونه‌های برداشت شده از دو سال متوالی به خوبی مورد بررسی قرار نگرفته است. بدین منظور، نمونه‌های زعفران برداشت شده از سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ برای تعیین میزان ترکیبات فرار و همچنین میزان کروسین و پیکروکروسین به ترتیب با استفاده از تکنیک واکنش انتقال پروتون- زمان پرواز- طیف سنج جرمی (PTR-TOF-MS) و روش استاندارد تجاری ایزو (ISO 3632) مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج تجزیه ترکیبات فرار نشان داد که ۱۱ ترکیب عمده از جمله سافرانال، اسید استیک، (H<sub>5</sub>)-فورانون، ایزوبوتانال، بایوجنیک آلدهید فرگمنت، ۴-کتوایزوفرون، استالدهید، بوتیرولاکتون، استون/پروپانال، متانول و ایزوفرون مسئول بیش از ۸۰ درصد ترکیبات فرار در ساختار ترکیبات فرار شناسایی شده زعفران بودند. نتایج مقایسه بین نمونه‌های نگهداری شده از دو سال مورد بررسی نشان داد که ترکیبات سافرانال، استیک اسید، (H<sub>5</sub>)-فورانون، بایوجنیک آلدهید فرگمنت و بوتیرولاکتون در نمونه‌های نگهداری شده از سال ۱۳۹۵ نسبت به نمونه‌های سال ۱۳۹۶ افزایش معنی‌داری (بین ۸۲-۵۶ درصد) نشان دادند. در مقابل، غلظت ایزومرهای ایزوفرون به‌عنوان پیش‌ساز سافرانال با کاهش نسبی همراه بود. به همین ترتیب، میزان کروسین و پیکروکروسین اندازه‌گیری شده به‌طور معنی‌داری بین نمونه‌های دو سال مورد بررسی متفاوت بود. در تمام نمونه‌های مورد بررسی، میزان عوامل رنگ و طعم زعفران به‌طور میانگین به ترتیب ۲۰ و ۱۴ درصد در نمونه‌های نگهداری شده از سال ۱۳۹۵ نسبت به نمونه‌های حاصل از سال ۱۳۹۶ کاهش نشان داد. براساس نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تغییر در میزان کروسین، پیکروکروسین و ترکیبات عمده فرار زعفران شامل سافرانال، استیک اسید، (H<sub>5</sub>)-فورانون، ایزوبوتانال و ایزوفرون را می‌توان به‌عنوان شاخصی برای تمایز نمونه‌های برداشت شده از سال جاری و نمونه‌های نگهداری شده سال‌های قبل مد نظر قرار داد.

**کلمات کلیدی:** پیکروکروسین، ترکیبات فرار، سافرانال، کروسین، کلاله زعفران

۱- فارغ التحصیل دوره دکتری، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

\* نویسنده مسئول: (khajoei@uk.ac.ir)

## مقدمه

et al., 2018; Maggi et al., 2010; Shao et al., 2014; Urbani et al., 2015). اخیراً از تکنیک واکنش انتقال پروتون- زمان پرواز- طیف سنج جرمی (PTR-TOF-MS)<sup>۷</sup> به عنوان روشی حساس، سریع، با دقت بالا، غیر تخریبی و با حداقل نیاز به هرگونه آماده سازی نمونه، جهت بررسی ترکیبات فرار در گیاهان مختلف از جمله زعفران استفاده شده است (Masi et al., 2016; Nenadis et al., 2016; Silvis et al., 2019; Ghanbari et al., 2019). علاوه بر ترکیبات مذکور، استیک اسید<sup>۸</sup>، ۲(H۵)-فورانون<sup>۹</sup>، ۲-فنیل اتانول<sup>۱۰</sup>، ۲-هیدروکسی-۴،۶،۶-تری متیل-۵،۲-سیکلوهگزادین-۱-اون<sup>۱۱</sup> در ارزیابی ترکیبات فرار زعفران با استفاده از PTR-TOF-MS گزارش شده است (Masi et al., 2016; Nenadis et al., 2019; Ghanbari et al., 2019; Silvis et al., 2019).

بر اساس نتایج مطالعات مرتبط، کیفیت زعفران طی زمان نگهداری می تواند تحت تأثیر قرار گیرد. در مطالعه تأثیر زمان نگهداری و فرآیند خشک کردن زعفران بر میزان ترکیبات مؤثره اندازه گیری شده با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)<sup>۱۲</sup> گزارش شده که میزان کروسین و پیکروکروسین بعد از یکسال نگهداری به میزان قابل توجهی کاهش و میزان سافرانال افزایش یافت (Chaouqi et al., 2018). همچنین سنجش ترکیبات عامل کیفیت زعفران با روش ایزو در طول فرآوری و نگهداری به طور معنی داری کاهش و عامل عطر زعفران افزایش یافت در حالی که میزان عامل طعم زعفران روند تغییرات

زعفران به عنوان یکی از با ارزش ترین و قیمتی ترین محصولات دارویی و ادویه ای در سرتاسر دنیا به شمار می رود. زعفران به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان عامل رنگ، طعم و عطر استفاده می شود؛ اما امروزه این محصول گیاهی ارزشمند به دلیل خواص بیولوژیکی متعدد در بهبود سلامتی انسان نیز مورد توجه قرار گرفته است (Gresta et al., 2008; Melnyk et al., 2010). خواص متعدد ذکر شده در این گیاه به طور عمده مرتبط با حضور ترکیبات آپوکاروتنوییدی کروسین، پیکروکروسین و سافرانال به ترتیب عامل رنگ، طعم و عطر خاص آن می باشد (Lage & Cantrell, 2009; Melnyk et al., 2010). سافرانال (۶،۲،۲-تری متیل-۳،۱-سیکلوهگزادین-۱-کربوکسالدئید)<sup>۱</sup> یکی از مهم ترین ترکیبات فرار در کلاله زعفران بوده که عامل اصلی عطر منحصر به فرد زعفران به شمار می رود (Lage & Cantrell, 2009; Maggi et al., 2010; Ghanbari et al., 2019).

ترکیبات فرار عمده زعفران علاوه بر سافرانال و ایزومرهای آن شامل ۴-هیدروکسی-۶،۶،۲-تری متیل-۱-سیکلوهگزادین-۱-کربوکسالدئید (HTCC)<sup>۲</sup>؛ ایزوفرون<sup>۳</sup>، ۶،۲،۲-تری متیل-۴،۱-سیکلوهگزادین-۱-اون<sup>۴</sup>، ۴-هیدروکسی-۵،۵،۳-تری متیل-۲-سیکلوهگزادین-۱-اون<sup>۵</sup> و ۴-کتوایزوفرون<sup>۶</sup> می باشند که توسط روش کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفته اند (Amanpour et al., 2015; Kanakis et al., 2004; Liu )

<sup>۷</sup> -Proton transfer reaction time-of-flight mass spectrometer (PTR-TOF-MS)

<sup>۸</sup>- Acetic acid

<sup>۹</sup> -2(3H)-furanone

<sup>۱۰</sup> -2-phenylethanol

<sup>۱۱</sup> -2-hydroxy-4,6,6-trimethyl-2,5-cyclohexadien-1-one

<sup>۱۲</sup> -High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

<sup>۱</sup> -2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene-1-carboxaldehyde

<sup>۲</sup>- 4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-carboxaldehyde (HTCC)

<sup>۳</sup> -3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

<sup>۴</sup> -2,2,6-trimethyl-1,4-cyclohexanedione

<sup>۵</sup> -4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one

<sup>۶</sup> -2,6,6-trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione (4-ketoisophorone)

پودر کردن نمونه‌های کلاله قبل از آنالیز توسط هاون سنتی مخصوص زعفران انجام شد. از هر نمونه اولیه ۳۵ میلی‌گرم کلاله پودر شده به بطری شیشه‌ای درب‌دار به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر (Schott Duran bottles, Germany) منتقل شد. بطری‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم با حالت لرزشی ملایم (۶۰ دور در دقیقه) جهت دستیابی به حالت تعادل در فضای خالی بالای نمونه<sup>۱</sup> قرار گرفتند (Nenadis et al., 2016). تمام آزمایشات مرتبط با این مطالعه در آزمایشگاه گروه کیفیت و طراحی مواد غذایی<sup>۲</sup> و همچنین بخش تحقیقات امنیت غذایی<sup>۳</sup> دانشگاه واخینگن هلند انجام شد.

#### آنالیز ترکیبات فرار با تکنیک PTR-TOF-MS

ترکیبات فرار کلاله زعفران با استفاده از تکنیک PTR-TOF-MS (Ionicon GmbH, Innsbruck, Austria) در محدوده جرمی  $18-448 \text{ m.z}^{-1}$  بررسی شد. تنظیمات دستگاه و شرایط محفظه انتقال آن براساس سیلوپس و همکاران (Silvis et al., 2019) انجام شد. پس از اتصال بطری حاوی نمونه به دستگاه، هوای فضای بالای نمونه در شرایط ولتاژ ۴۶۵ ولت، دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد، فشار ۲/۳۰ میلی بار لوله انتقال به دستگاه منتقل شد. آنالیز ترکیبات فرار بین دو سال مورد بررسی در سه نمونه برداشت شده و در سه تکرار انجام و جهت اطمینان از نتایج، در هر نمونه دو بار مورد تجزیه قرار گرفت و میانگین اندازه‌گیری‌ها برای هر تکرار گزارش شد. مدت قرار گرفتن هر نمونه ۶۰ ثانیه بود و برای هر نمونه میانگین داده‌ها در بین چرخه ۲۵-۴۵ ثانیه گزارش شد. تبدیل تراکم یونی (تعداد شمارش در ثانیه؛ cps<sup>۴</sup>) به غلظت هر ترکیب (قسمت در میلیارد

مشخصی را نشان نداد (Bolandi & Ghodduzi, 2006).

عطر زعفران نیز پس از برداشت به تدریج در طول دوره خشک شدن از طریق تجزیه پیکروکروموسین، پیش‌ساز سافرانال، افزایش می‌یابد (Carmona et al., 2007). سافرانال نیز به نوبه خود قابلیت تجزیه به دیگر ترکیبات فرار زعفران را دارا می‌باشد (Maggi et al., 2010). ترکیبات فرار عمده در زعفران تحت تأثیر زمان‌های نگهداری مختلف (از کمتر از یک سال تا ۸-۹ سال) قرار می‌گیرند. مگی و همکاران (Maggi et al., 2010) گزارش کردند که میزان سافرانال طی سال‌های اول تا چهارم نگهداری روندی افزایشی دارد و با افزایش مدت زمان نگهداری به ۸ تا ۹ سال، مقدار سافرانال کاهش می‌یابد، در حالی که در مورد سایر ترکیبات روند تغییرات متفاوت بود. بر این اساس، هدف از این آزمایش بررسی روند تغییر در ترکیبات فرار زعفران در فاصله بین دو سال زراعی متوالی و مقایسه بین زعفران برداشت شده از سال جاری و زعفران سال قبل بود.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری مزرعه‌ای و مواد گیاهی

نمونه‌برداری در سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ (به ترتیب سال دوم و سوم گل‌دهی زعفران) از یک مزرعه تحقیقاتی زعفران واقع در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان ( $30^{\circ}14'40''$  شمالی؛  $57^{\circ}07'15''$  شرقی و ارتفاع ۱۷۷۴ متر از سطح دریا) انجام شد. پس از برداشت و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، کلاله‌ها از گل‌ها جدا شده و در ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون (Chaouqi et al., 2018; Shao et al., 2014) خشک شدند. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق و در پاکت‌های در بسته به دور از نور تا زمان مورد نظر نگهداری شدند. مدت زمان فرآوری و نگهداری تا آنالیز نمونه‌ها برای نمونه‌های سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ به ترتیب ۱۵ ماه و ۳ ماه بود.

آماده‌سازی نمونه‌ها به منظور آنالیز ترکیبات فرار

۱ -Headspace

۲ -Food Quality and Design Group

۳ -Wageningen Food Safety Research

۴ -Number of counts per second; cps

با استفاده از طیف سنج نوری فرا بنفش / مرئی (CARY 50 Bio UV-Vis, US) تعیین و براساس روابط زیر محاسبه و گزارش شد (Lage & Cantrell, 2009):

$$E_{1cm}^{1\%} = (D \times 10000) / (m \times (100 - H))$$

$D$ : مقادیر جذب در طول موج‌های ذکر شده برای هر ترکیب  
 $m$ : وزن اولیه نمونه مورد استفاده (گرم)  
 $H$ : نسبت جرم (میزان رطوبت و مواد فرار نمونه)  
نسبت رطوبت و ترکیبات فرار پس از قرار دادن نمونه کلاله در دمای ۱۰۳ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت، از رابطه زیر حاصل شد (Cossignani et al., 2014):

$$H = [(W_1 - W_2) / (W_1)] \times 100$$

$W_1$ : وزن نمونه اولیه

$W_2$ : وزن نمونه پس از قرار دادن در دمای ۱۰۳ درجه سانتیگراد  
هر نمونه در سه تکرار مورد تجزیه قرار گرفت شد و میانگین سه تکرار برای هر نمونه گزارش شد.

#### آنالیز آماری

از بین ۹۴ ترکیب شناسایی شده، ۱۱ ترکیب عمده که ۸۳ درصد و ۱۱ ترکیب با فراوانی کمتر که ۹ درصد کل ترکیبات شناسایی شده در کلاله زعفران را تشکیل می‌دادند جهت تعیین اختلاف بین نمونه‌ها مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS ver. 9.0 انجام شد (SAS, Cary, NC, USA). میانگین‌ها توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ( $P < 0.05$ , LSD) مورد مقایسه قرار گرفتند. جهت مقایسه و بررسی دقیق روند تغییرات نمونه‌ها بین سال‌های مورد بررسی، مقایسات گروهی انجام شد و نتایج آن ارائه شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی<sup>۳</sup> توسط نرم افزار XLSTAT 2016 (Addinsoft, New York, NY, )

براساس حجم؛ (ppbv<sup>۱</sup>) براساس روش لیندینگر و جردن (Lindinger & Jordan, 1998) انجام شد. داده‌های حاصل از خروجی دستگاه توسط نرم افزارهای IDL 6.4 و RStudio به فایل عددی تبدیل شدند. سپس، یون‌های حاصل از منبع یونی دستگاه (جدول ۱) از مجموعه داده‌ها حذف شدند. در نهایت از بین بیش از ۵۰۰ جرم موجود در ساختار ترکیبات فرار زعفران، ۹۴ ترکیب فرار به صورت تجربی توسط دستگاه و همچنین براساس منابع علمی مختلف شناسایی شد (Ghanbari et al., 2019).

جدول ۱- یون‌های حاصل از منبع یونی PTR-TOF-MS

Table 1- Ions associated with the PTR-TOF-MS ion source

یون Ion	جرم Mass (m.z <sup>-1</sup> )	یون Ion	جرم Mass (m.z <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O+	18.010	(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> H+	37.027
H <sub>3</sub> O+	19.018	H <sub>2</sub> O·H <sub>2</sub> [18]O H+	39.033
N <sub>2</sub> +	28.006	CO <sub>2</sub> +	43.99
NO+	29.998	CO <sub>2</sub> ·H+	44.997
O <sub>2</sub> +	31.989	NO <sub>2</sub> +	45.993
N[18]O+	32.001	(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ·H+	55.038

#### اندازه‌گیری ترکیبات کروسین و پیکروکروسین

جهت بررسی روند تغییر در میزان کروسین و پیکروکروسین، هر نمونه در سه تکرار مورد تجزیه قرار گرفت شد و میانگین سه تکرار برای هر نمونه گزارش شد. عامل رنگ و طعم تلخ زعفران با استفاده از روش استاندارد تجاری ایزو ۳۶۳۲ (ISO/TS 3632, 2003) تعیین شد. بر اساس این روش، ۵۰ میلی‌گرم نمونه پودر شده زعفران در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به مدت یک ساعت و به دور از نور، با هم‌زدن روی هم‌زن مغناطیسی مغناطیسی عصاره‌گیری شد (Cossignani et al., 2014). سپس محلول براساس روش مذکور به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد. میزان کروسین و پیکروکروسین به ترتیب با توجه به حداکثر جذب عصاره آبی حاصل در طول موج‌های ۴۴۰ و ۲۵۷ نانومتر،

۱- Part per billion by volume; ppbv

۲- ISO 3632 trade standard

۳- Principal component analysis (PCA)

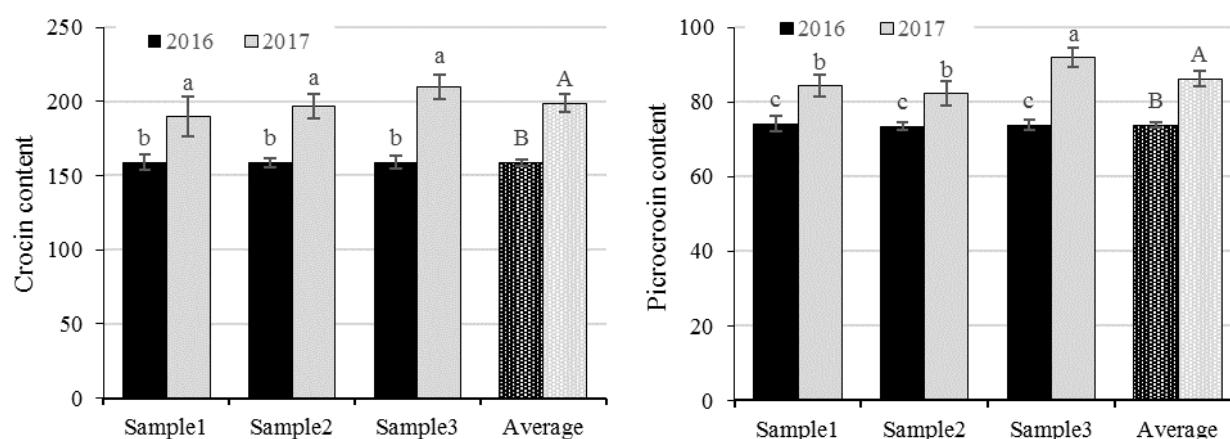
(USA) انجام شد.

## نتایج و بحث

## تغییر در میزان کروسین و پیکروکروسین

روند تغییرات در میزان کروسین و پیکروکروسین بین نمونه‌های حاصل از دو سال، مشابه بود (شکل ۱). همان‌طور که ملاحظه می‌شود، میزان کروسین و پیکروکروسین در نمونه‌های برداشت شده از سال ۱۳۹۵ نسبت به نمونه‌های سال جدید (۱۳۹۶) به ترتیب به‌طور میانگین ۲۰ و ۱۴ درصد کاهش نشان دادند. به‌طور کلی میزان آپوکاروتنوئیدهای مسئول رنگ و طعم زعفران در نمونه‌های نگهداری شده از سال قبل نسبت به نمونه‌های سال جدید به‌طور معنی‌داری کاهش نشان دادند. یکی از مهم‌ترین دلایل این کاهش، هیدرولیز این ترکیبات در طول دوره فرآوری و نگهداری به ترکیبات دیگر نظیر سافرانال

است (Carmona et al., 2007). در تأیید این نتایج، با مطالعه تأثیر زمان نگهداری و فرایند خشک کردن زعفران، گزارش شد که نمونه‌های نگهداری شده پس از یک سال کاهش قابل توجهی در میزان کروسین و پیکروکروسین و افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان سافرانال اندازه‌گیری شده توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان دادند (Chaouqi et al., 2018). در طول فرآوری و نگهداری زعفران، سنجش ترکیبات عامل کیفیت زعفران با روش ایزو نشان داد که میزان کروسین در طول زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری کاهش و میزان سافرانال افزایش یافت و میزان تغییرات پیکروکروسین روند مشخصی نشان نداد (Bolandi & Ghoddusi, 2006).



شکل ۱- تغییر در میزان کروسین و پیکروکروسین بین نمونه‌های حاصل از سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶. میانگین‌های سه نمونه حاصل از دو سال مورد بررسی، توسط مقایسه گروهی مورد مقایسه قرار گرفته و در ستون‌های آخر با حروف بزرگ نشان داده شده است ( $n = 9$ )

Figure 1- Change in crocin and picrocrocin contents between samples obtained from 2016 and 2017. Averages of the three samples obtained from two studied years are compared by orthogonal contrast and the results are shown with capital letters in the last columns ( $n = 9$ ).

## عمده‌ترین ترکیبات فرار کلالة

با وجود فراوانی متفاوت ترکیب‌های شناسایی شده در بین نمونه‌های دو سال، عمده غلظت ترکیبات فرار شناسایی شده (به‌طور میانگین حدود ۸۳ درصد) در ساختار ترکیبات فرار کلالة زعفران بین نمونه‌های مورد اندازه‌گیری در دو سال برداشت به

۱۱ ترکیب اختصاص داشت (جدول ۲). سافرانال (جرم  $m.z^{-1}$  ۱۵۱/۱۳<sup>l</sup>؛ ۲۱-۱۵ درصد ترکیبات فرار شناسایی شده)، استیک اسید ( $m.z^{-1}$  ۶۱/۰۲۸؛ ۱۹-۱۶ درصد)، ۲(H۵)-فورانون ( $m.z^{-1}$  ۷۳/۰۶۵؛ ۱۱-۷٪) ایزوبوتانال ( $m.z^{-1}$  ۸۵/۰۲۹؛ ۱۷-۱۵ درصد)،

سال جدید افزایش نشان داد. با روند مشابه، این افزایش در غلظت ترکیبات اسید استیک،  $2(H_5)$ -فورانون و بایوجنیک آلدئید فرگمنت به ترتیب ۵۷، ۵۶ و ۶۲ درصد بود. همچنین میزان بوتیرولاکتون در نمونه‌های نگهداری شده از سال ۱۳۹۵ با افزایش ۷۷ درصدی همراه بود. در مقابل، ترکیبات ایزوفرون و ۴-کتوایزوفرون در دو نمونه از نمونه‌های نگهداری شده از سال قبل روند کاهشی نشان دادند. با وجود کاهش ۲۸/۴ و ۱۹/۴ درصدی به ترتیب در غلظت ترکیبات ایزوفرون و ۴-کتوایزوفرون در نمونه‌های سال ۱۳۹۶، نتایج مقایسه گروهی سه ترکیب حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌های حاصل از دو سال بود (جدول ۲).

سافرانال به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب فرار در زعفران در این مطالعه در نمونه‌های سال ۱۳۹۵ به‌طور معنی‌داری در طول زمان افزایش یافت. مطالعات مختلف با مشاهده نتایج مشابه، دلیل این تغییر در محتوای سافرانال را با تجزیه تدریجی پیکروکروستین مرتبط دانسته‌اند (Carmona et al., 2007; D'Auria et al., 2006). در مطالعه‌ای دیگر (D'Auria et al., 2006) گزارش شده که محتوای سافرانال تعیین شده با روش SPME-GC-MS در سال اول نگهداری، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و پس از آن کاهش می‌یابد. همچنین در تحقیقات گزارش شده است که محتوای سافرانال اندازه‌گیری شده با روش GC-MS در دو سال اول نگهداری افزایش یافته است (Carmona et al., 2007; 2006; Maggi et al., 2010). افزایش در سایر ترکیبات فرار مهم دیگر نیز می‌تواند حاصل تجزیه ترکیبات عامل کیفیت زعفران در طول زمان نگهداری باشد. در مطالعه کارمونا و همکاران (Carmona et al., 2006) گزارش شد که زآگزانتین و ایزومرهای مختلف کروستین عامل اصلی تولید ترکیبات فرار در طول زمان نگهداری هستند. این نتایج توسط تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲). همان‌طور

درصد)، بایوجنیک آلدئید فرگمنت ( $0.17m.z^{-1}/43$ ؛ ۹-۷ درصد)، ۴-کتوایزوفرون ( $0.93m.z^{-1}/153$ ؛ ۴-۲/۴ درصد)، استالدهید ( $0.34m.z^{-1}/45$ ؛ ۳/۶-۲/۲ درصد)، بوتیرولاکتون ( $0.44m.z^{-1}/87$ ؛ ۳/۱-۲/۳ درصد)، استون/پروپانال ( $0.33m.z^{-1}/33$ ؛ ۲/۲-۱/۸ درصد)، متانول ( $0.33m.z^{-1}/33$ ؛ ۲/۲-۱/۸ درصد) و ایزوفرون ( $112m.z^{-1}/139$ ؛ ۲/۴-۱/۳ درصد) بیشترین فراوانی ترکیبات فرار کلاله را تشکیل دادند. از بین ترکیبات مذکور، سافرانال،  $2(H_5)$ -فورانون، استیک اسید، ایزوفرون و ۴-کتوایزوفرون در بسیاری منابع به‌عنوان عمده‌ترین ترکیبات فرار در کلاله زعفران در غلظت‌های بالا با روش‌های مختلف تجزیه‌ای شامل روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC-MS) (Kanakis et al., 2004; Maggi et al., 2010; Amanpour et al., 2015)، روش میکرو استخراج با فاز جامد-کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (SPME-GC-MS) (D'Auria et al., 2006; Urbani et al., 2015) و تکنیک واکنش انتقال پروتون-طیف سنج جرمی (PTR-MS) (Nenadis et al., 2016; Silvis et al., 2019) شناسایی و معرفی شده‌اند. همچنین ترکیبات بایوجنیک آلدئید فرگمنت، استالدهید، بوتیرولاکتون، استون/پروپانال، ایزوبوتانال و متانول در مطالعه سیلوپس و همکاران (Silvis et al., 2019) در سنجش ترکیبات فرار کلاله زعفران با استفاده از تکنیک PTR-TOF-MS شناسایی و گزارش شده است.

#### تغییر در محتوای ترکیبات فرار عمده در دو سال مورد بررسی

نتایج تجزیه واریانس برای ۹۴ ترکیب فرار شناسایی شده نشان داد غلظت برخی ترکیبات تحت تأثیر زمان نگهداری بین دو سال مورد بررسی متفاوت بود (جدول ۲ و ۳). از بین ترکیبات عمده موجود در ساختار ترکیبات فرار زعفران، غلظت سافرانال در نمونه‌های نگهداری شده از سال ۱۳۹۵، بین ۱۶۳-۳۴ درصد (به‌طور میانگین ۸۱/۵ درصد) نسبت به نمونه‌های

نمونه‌های زعفران حاصل از سه سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۲ به‌طور معنی‌داری با افزایش زمان نگهداری کاهش یافت و بیشترین مقادیر در نمونه‌های برداشت شده از سال‌های جدیدتر یافت شد (D'Auria et al., 2006). ترکیب HTCC به‌عنوان پیش‌ساز سافرانال (Carmona et al., 2006)، در نمونه‌های زعفران در این بررسی شناسایی نشد. در برخی مطالعات این ترکیب در کلاله زعفران شناسایی شده است (Amanpour et al., 2015; Kanakis et al., 2004; Nenadis et al., 2016). در مقابل، در مطالعات مختلف با استفاده از تکنیک‌های PTR-TOF-MS و GC-MS در نمونه‌های زعفران حاصل از کشورهای ایران، ایتالیا و چین شناسایی نشد (Masi et al., 2016; Liu et al., 2018).

متانول در نمونه‌های حاصل از سال ۱۳۹۵ در طول زمان در یکی از نمونه‌های مورد بررسی کاهش نشان داد. نتیجه مقایسات گروهی نمونه‌ها نشان از عدم تغییر معنی‌دار متانول در نمونه‌های هر دو سال بود. به‌طور مشابه، بین نمونه‌های مورد بررسی حاصل از دو سال از نظر غلظت ترکیبات استون ( $P = 0/52$ ) و ایزوبوتانال ( $P = 0/39$ ) نیز تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

#### ترکیبات فرار با فراوانی جزیی

ترکیبات هگزنال (جرم  $83/085 \text{ m.z}^{-1}$ )، ۱-t-بوتیل سیکلوپنتادین ( $123/116 \text{ m.z}^{-1}$ )، ۲-هیدروکسی ایزوفرون ( $155/108 \text{ m.z}^{-1}$ )، فنل ( $95/049 \text{ m.z}^{-1}$ )، پروپانویک اسید/ متیل استات ( $75/044 \text{ m.z}^{-1}$ )، بوتانویک اسید/ اتیل استات ( $89/059 \text{ m.z}^{-1}$ )، ایزوپرن ( $69/069 \text{ m.z}^{-1}$ )، ۳-دی-متیل-۶،۱-اکتادین ( $139/144 \text{ m.z}^{-1}$ )، الکل فرگمنت ( $57/069 \text{ m.z}^{-1}$ )، جنرال آلکین ( $43/053 \text{ m.z}^{-1}$ ) و آلکیلک فرگمنت ( $41/038 \text{ m.z}^{-1}$ ) در مقادیر جزیی‌تر، ۹ درصد از ساختار ترکیبات فرار شناسایی شده زعفران را تشکیل دادند (جدول ۳).

که ذکر شد، از طرفی محتوای بالا در ترکیبات فرار عمده سافرانال، استیک اسید، ۲(H5)-فورانون، بایوجنیک آلدئید فرگمنت و بوتیرولاکتون در نمونه‌های سال ۱۳۹۵ و از طرف دیگر محتوای بالای ترکیبات ایزوبوتانال، ایزوفرون، استالدهید و ۴-کتوایزوفرون همچنین مقادیر بالاتر کروسین و پیکروکروسین در نمونه‌های سال ۱۳۹۶ موجب تمایز نمونه‌های مختلف شد. همچنین وجود ارتباط منفی بین محتوای ترکیبات عمده فرار زعفران و محتوای کروسین و پیکروکروسین نتایج گزارش‌های مذکور (D'Auria et al., 2006; Carmona et al., 2007, 2006) را تأیید می‌کند (شکل ۲).

کاهش نسبی غلظت ایزوفرون و ۴-کتوایزوفرون (ترکیبات C9) در نمونه‌های حاصل از سال قبل و همچنین افزایش غلظت سافرانال نیز تأیید می‌کند که این ترکیبات احتمالاً به‌عنوان پیش‌سازهای تولید سافرانال در طول زمان نگهداری عمل می‌کنند، همان‌طور که مشابه این نتایج در تحقیقات دیگر گزارش شده است (Maggi et al., 2010). همان‌طور که نتایج این مطالعه نشان داد، با توجه به افزایش غلظت اکثر ترکیبات  $C_{10}$  و کاهش ترکیبات  $C_9$  در نمونه‌های سال ۱۳۹۵، و با توجه به شباهت ساختاری این ترکیبات با سافرانال (Maggi et al., 2010) به نظر می‌رسد این ترکیبات قابل تبدیل به سافرانال باشند (Carmona et al., 2006).

علاوه بر این، مگی و همکاران (Maggi et al., 2010) گزارش کردند که محتوای ۴-هیدروکسی-۲،۶-تری-متیل-۱-سیکلوهگزن-۱-کربوکسالدهید (HTCC) و ایزوفرون در طول سال اول نگهداری به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابند. همچنین کارمونا و همکاران (Carmona et al., 2006) ایزوفرون را پیش‌ساز بسیاری از ترکیبات فرار زعفران در طول دوره نگهداری گزارش کردند. ترکیب ۳،۵،۵-تری-متیل-۳-سیکلوهگزن-۱-اون<sup>۲</sup> (از ایزومرهای ایزوفرون) در مطالعه

1-4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-carboxaldehyde (HTCC)

۲ 3,5,5-trimethyl-3-cyclohexen-1-one

جدول ۳- مقایسه محتوای ترکیبات فرار عمدۀ شناسایی شده کلانۀ زعفران (قسمت در میلیارد به ازای حجم (ppbv)) بین نمونه‌های حاصل از دو سال ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶. آنالیز شده توسط PTR-TOF-MS

Table 2- Comparison of identified volatile compounds of saffron stigmas (in parts per billion per volume (ppbv)) between samples harvested from 2016 and 2017 analyzed by PTR-TOF-MS

جرم Mass (m.z <sup>+</sup> )	ترکیب فرار Volatile compound	فرمول Formula	نمونه ۱ Sample 1		نمونه ۲ Sample 2		نمونه ۳ Sample 3		میانگین Average	
			2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
33.033	متانول Methanol	CH <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	74± 6 <sup>ab</sup>	68± 7 <sup>b</sup>	80± 5 <sup>ab</sup>	85± 1 <sup>ab</sup>	88± 5 <sup>a</sup>	70± 3 <sup>b</sup>	81± 3 <sup>A</sup>	74± 4 <sup>A</sup>
43.017	پایوچیک الدهید فرگمنت Biogenic aldehyde fragment	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> OH <sup>+</sup>	333± 102 <sup>ab</sup>	207± 41 <sup>b</sup>	450± 2 <sup>a</sup>	321± 54 <sup>ab</sup>	453± 35 <sup>a</sup>	225± 8 <sup>b</sup>	406± 108 <sup>A</sup>	251± 79 <sup>B</sup>
45.034	استالدهید Acetaldehyde	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> OH <sup>+</sup>	80± 11 <sup>c</sup>	119± 17 <sup>ab</sup>	86± 1 <sup>c</sup>	143± 3 <sup>a</sup>	138± 3 <sup>a</sup>	104± 9 <sup>bc</sup>	101± 17 <sup>A</sup>	122± 14 <sup>A</sup>
59.048	استون پروپنال Acetone; Propenal	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OH <sup>+</sup>	92± 19 <sup>ab</sup>	87± 8 <sup>ab</sup>	111± 8 <sup>a</sup>	116± 3 <sup>a</sup>	93± 20 <sup>ab</sup>	70± 4 <sup>b</sup>	99± 9 <sup>A</sup>	91± 7 <sup>A</sup>
61.028	استیک اسید Acetic acid	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	651± 169 <sup>ab</sup>	446± 94 <sup>b</sup>	946± 84 <sup>a</sup>	690± 121 <sup>ab</sup>	973± 7 <sup>a</sup>	500± 18 <sup>b</sup>	857± 225 <sup>A</sup>	545± 173 <sup>B</sup>
73.065	ایزوبوتنال ۲-متیل پروپنال Isobutanal/ 2- Methylpropanal	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> OH <sup>+</sup>	270± 28 <sup>ab</sup>	504± 149 <sup>a</sup>	184± 19 <sup>b</sup>	352± 65 <sup>ab</sup>	461± 78 <sup>a</sup>	259± 11 <sup>ab</sup>	305± 48 <sup>A</sup>	372± 59 <sup>A</sup>
85.029	۲-فورانون 2-(5H)-Furanone	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	755± 164 <sup>ab</sup>	473± 61 <sup>c</sup>	812± 25 <sup>a</sup>	546± 11 <sup>bc</sup>	840± 76 <sup>a</sup>	522± 86 <sup>bc</sup>	802± 163 <sup>A</sup>	513± 97 <sup>B</sup>
87.044	بوترولاکتون Butyrolactone	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	126± 28 <sup>ab</sup>	64± 4 <sup>c</sup>	152± 8 <sup>a</sup>	111± 10 <sup>b</sup>	143± 13 <sup>ab</sup>	60± 6 <sup>c</sup>	140± 30 <sup>A</sup>	79± 27 <sup>B</sup>
139.112	ایزوفورون Isophorone	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sup>+</sup>	55± 7 <sup>b</sup>	124± 35 <sup>a</sup>	68± 8 <sup>b</sup>	83± 9 <sup>ab</sup>	51± 6 <sup>b</sup>	35± 8 <sup>b</sup>	58± 9 <sup>A</sup>	81± 24 <sup>A</sup>
151.113	سافرانال Safranal	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sup>+</sup>	727± 115 <sup>bc</sup>	480± 134 <sup>c</sup>	1153± 95 <sup>a</sup>	438± 39 <sup>c</sup>	945± 16 <sup>ab</sup>	639± 88 <sup>c</sup>	942± 226 <sup>A</sup>	519± 170 <sup>B</sup>
153.093	۴-کتوایزوفورون 4-Ketoisophorone	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	100± 13 <sup>bc</sup>	177± 18 <sup>a</sup>	129± 26 <sup>ab</sup>	158± 35 <sup>a</sup>	95± 18 <sup>bc</sup>	68± 15 <sup>c</sup>	108± 15 <sup>A</sup>	134± 30 <sup>A</sup>

Mean ± standard error (n = 3) for each compound; different superscript letters in a row indicate statistically significant differences (LSD; P ≤ 0.05). Averages of the three samples obtained from two studied years are compared by orthogonal contrast and the results are shown with capital letters in the last columns (n = 9).  
 در ستون‌های آخر با حروف بزرگ معنی دار (LSD; P ≤ 0.05) میانگین سه نمونه حاصل از دو سال مورد مقایسه گروهی مورد مقایسه قرار گرفته و میانگین ± خطای استاندارد (n = 3) برای هر ترکیب، حروف متفاوت در هر ردیف میانگین اختلاف آماری معنی دار (LSD; P ≤ 0.05) می‌باشد. میانگین سه نمونه حاصل از دو سال مورد مقایسه توسط مقایسه مقایسه گروهی مورد مقایسه قرار گرفته و



1,4-dione) که در این بررسی به عنوان ترکیب فرار با فراوانی جزئی شناسایی شد، مهم‌ترین ترکیبات C9 در ساختار ترکیبات فرار زعفران به شمار می‌روند (Carmona et al., 2006; Maggi et al., 2010). با این وجود ارتباط خاصی بین تغییر در محتوای ۲-هیدروکسی ایزوفرون و ترکیبات عمده زعفران نظیر سافرانال مشاهده نشد.

#### تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

به منظور بررسی میزان تنوع در نمونه‌های مختلف براساس پارامترهای مورد بررسی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد و نمودار مربوط به آن براساس دو مؤلفه اصلی اول رسم شد (شکل ۲). همان‌طور که ملاحظه می‌شود، دو مؤلفه اول ۷۶/۵۷ درصد از کل تنوع را توجیه کردند. مؤلفه اول با توجیه حدود ۵۰ درصد واریانس، با ترکیبات عمده فرار سافرانال، استیک اسید، ۲(H۵)-فورانون، بایوجنیک آلدئید فرگمنت و بوتیرولاکتون و ترکیبات با فراوانی کمتر شامل ۱-t-بوتیل سیکلوپنتادین، جنرال آلکین، فنل و الکل فرگمنت همبستگی مثبت و با میزان کرووسین و پیکروکروسین همبستگی منفی نشان داد. همان‌طور که مشاهده شد، با توجه به محتوای بالاتر این ترکیبات فرار در نمونه‌های ۱۳۹۵، این متغیرها بیشترین سهم را در تمایز این نمونه‌ها از نمونه‌های ۱۳۹۶ دارا بودند. در مقابل، ترکیبات ایزوبوتانال، ایزوفرون، استالدهید و ۴-کتوایزوفرون از ترکیبات عمده و هگزنال، و ایزوپرن از ترکیبات با فراوانی جزئی با ارتباط مثبتی که با نمونه‌های ۱ و ۲ سال ۱۳۹۶ نشان دادند، باعث تمایز این نمونه‌ها از سایر نمونه‌ها شدند. همچنین ارتباط منفی کرووسین و پیکروکروسین با مؤلفه اول و ارتباط مثبت آن‌ها با نمونه‌های سال ۱۳۹۶ موجب تمایز این نمونه‌ها از نمونه‌های سال ۱۳۹۵ شد (شکل ۲).

#### تغییر در محتوای ترکیبات فرار جزئی در دو سال مورد بررسی

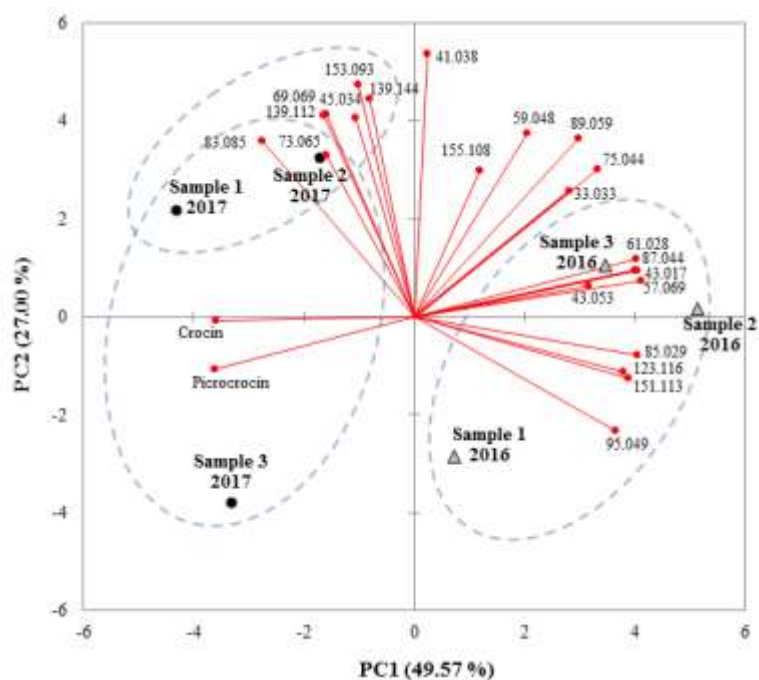
نتایج مقایسه بین نمونه‌های حاصل از دو سال (جدول ۳) نشان داد که بین ۱۱ ترکیب با سهم جزئی‌تر در ساختار ترکیبات فرار زعفران، هگزنال و ایزوپرن در نمونه‌های نگهداری شده از سال ۱۳۹۵ به ترتیب ۵۶ و ۳۰ درصد نسبت به نمونه‌های برداشت شده از سال ۱۳۹۶ کاهش نشان دادند. این در حالی است که ترکیبات ۱-t-بوتیل سیکلوپنتادین، فنل و الکل فرگمنت در نمونه‌های سال ۱۳۹۵ افزایش معنی‌داری (به ترتیب افزایش ۶۱، ۶۲ و ۲۹ درصدی) نسبت به نمونه‌های حاصل از ۱۳۹۶ نشان دادند. سایر ترکیبات شامل ۲-هیدروکسی ایزوفرون، پروپانویک اسید/متیل استات، بوتانویک اسید/اتیل استات، ۳-۷-دی متیل-۱-۶-اکتادین، جنرال آلکین و آلکیلک فرگمنت تغییر معنی‌داری در محتوا بین نمونه‌های دو سال نشان ندادند (جدول ۳).

در مورد ترکیبات مذکور و نحوه تغییر آن‌ها در طول زمان نگهداری اطلاعاتی در دست نیست. با این حال براساس نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (شکل ۲)، ترکیبات ۱-t-بوتیل سیکلوپنتادین، جنرال آلکالین، فنل و الکل فرگمنت را می‌توان به عنوان شاخص تمایز برای نمونه‌های سال قبل و هگزنال و ایزوپرن را به عنوان شاخص برای شناسایی نمونه‌های سال جدید معرفی کرد. براساس ارتباط منفی مشاهده شده بین ترکیبات فرار عمده در این مطالعه شامل ایزوبوتانال، ایزوفرون، ۴-کتوایزوفرون، استالدهید و ترکیبات جزئی فرار نظیر هگزنال و ایزوپرن با محتوای سافرانال (شکل ۲) این امکان وجود دارد که این ترکیبات را بتوان به عنوان ترکیبات پیش‌ساز سافرانال در دوره نگهداری نام برد. همان‌طور که ذکر شد، ترکیبات ایزوفرون، ۴-کتو ایزوفرون و سایر ایزومرهای ایزوفرون مانند ۲-هیدروکسی ایزوفرون (-2,6,6-Trimethylcyclohexan)

جدول ۳- مقایسه محتوای ترکیبات فرار شناسایی شده جزئی کلاه زعفران (قسمت در میلیارد به ازای حجم (ppbv)) بین نمونه‌های حاصل از دو سال ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ آنالیز شده توسط PTR-TOF-MS

جرم Mass (m.z <sup>+</sup> )	ترکیب فرار Volatile compound	فرمول Formula	نمونه ۱ Sample 1		نمونه ۲ Sample 2		نمونه ۳ Sample 3		میانگین Average	
			2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
41.038	الکیلک فرگمنت Alkylc fragment	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> H <sup>+</sup>	17±0.2 <sup>a</sup>	24±4.3 <sup>a</sup>	22±4.0 <sup>a</sup>	23±2.0 <sup>a</sup>	23±2.1 <sup>a</sup>	18±1.9 <sup>a</sup>	21±1.6 <sup>a</sup>	22±1.7 <sup>a</sup>
43.053	جیرال الکیل General alkane	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> H <sup>+</sup>	17±2.1 <sup>b</sup>	18±2.7 <sup>b</sup>	34±9.6 <sup>a</sup>	19±1.4 <sup>ab</sup>	21±1.1 <sup>ab</sup>	19±3.7 <sup>b</sup>	24±3.9 <sup>a</sup>	19±1.4 <sup>a</sup>
57.069	الکل فرگمنت Alcohol fragment	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> H <sup>+</sup>	24±1.5 <sup>ab</sup>	20±1.7 <sup>b</sup>	28±2.7 <sup>a</sup>	23±0.6 <sup>ab</sup>	28±2.8 <sup>a</sup>	21±1.6 <sup>b</sup>	27±4.3 <sup>a</sup>	21±2.5 <sup>b</sup>
69.069	ایزوپرن Isoprene	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> H <sup>+</sup>	16±1.3 <sup>c</sup>	33±3.9 <sup>ab</sup>	20±1.9 <sup>bc</sup>	39±2.3 <sup>a</sup>	34±8.5 <sup>a</sup>	27±3.0 <sup>abc</sup>	23±1.1 <sup>b</sup>	33±7 <sup>a</sup>
75.044	پروپنویک اسید مثل استات Propionic acid; Methyl-acetate	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	33±6.8 <sup>ab</sup>	31±3.9 <sup>b</sup>	44±2.1 <sup>a</sup>	41±3.1 <sup>ab</sup>	44±1.1 <sup>a</sup>	29±2.2 <sup>b</sup>	40±2.8 <sup>a</sup>	34±2.4 <sup>a</sup>
83.085	هگزنال؛ سیکلوکسکرن Hexenal; Cyclohexene	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> H <sup>+</sup>	20±0.1 <sup>d</sup>	66±6.4 <sup>ab</sup>	25±4.0 <sup>d</sup>	85±4.0 <sup>a</sup>	46±9.4 <sup>a</sup>	53±7.7 <sup>bc</sup>	30±15 <sup>b</sup>	68±17 <sup>a</sup>
89.059	بوتانویک اسید اتیل استات Butanoic acid; Ethyl acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	26±5.7 <sup>a</sup>	27±6.7 <sup>a</sup>	35±1.2 <sup>a</sup>	32±2.6 <sup>b</sup>	33±0.4 <sup>a</sup>	25±3.0 <sup>a</sup>	31±2.2 <sup>a</sup>	28±2.5 <sup>a</sup>
95.049	فیل Phenol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sup>+</sup>	40±4.1 <sup>ab</sup>	26±6.5 <sup>cd</sup>	53±5.7 <sup>a</sup>	23±1.0 <sup>d</sup>	47±1.8 <sup>ab</sup>	37±2.8 <sup>bc</sup>	47±8 <sup>a</sup>	29±9 <sup>b</sup>
123.116	۱-۴-بوتیل سیکلوپنتادیئن 1-4-Butylcyclopentadiene	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> H <sup>+</sup>	44±6.1 <sup>bc</sup>	34±8.7 <sup>c</sup>	71±7.9 <sup>a</sup>	31±2.7 <sup>c</sup>	60±3.3 <sup>ab</sup>	43±5.2 <sup>bc</sup>	58±15 <sup>a</sup>	36±11 <sup>b</sup>
139.144	۷،۷-دی متیل-۱،۶-اکتادین 3,7-Dimethyl-1,6-octadiene	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> H <sup>+</sup>	19±7.3 <sup>b</sup>	38±18 <sup>b</sup>	30±5.6 <sup>a</sup>	32±9.2 <sup>b</sup>	18±2.5 <sup>a</sup>	13±3.7 <sup>a</sup>	22±3.3 <sup>a</sup>	28±7.1 <sup>a</sup>
155.108	۲-هیدروکسی فسفورن 2-Hydroxyisophorone	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	40±16 <sup>a</sup>	56±28 <sup>a</sup>	50±14 <sup>a</sup>	32±8.5 <sup>a</sup>	40±12 <sup>a</sup>	16±6.7 <sup>a</sup>	43±7.2 <sup>a</sup>	35±11 <sup>a</sup>

میانگین ± خطای استاندارد (n=3) برای هر ترکیب. حروف متفاوت در هر ردیف یا در سطرهای مختلف نشان دهنده تفاوت در هر ردیف یا در سطرهای مختلف است (P<0.05). میانگین‌های در سطرهای مختلف نشان داده شده است (n=9).  
 Mean ± standard error (n = 3) for each compound; different superscript letters in a row indicate statistically significant differences (LSD; P<0.05). Averages of the three samples obtained from two studied years are compared by orthogonal contrast and the results are shown with capital letters in the last columns (n = 9).



شکل ۲- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای نمونه‌های مختلف زعفران حاصل از سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ براساس ترکیبات فرار و میزان ترکیبات عامل کیفیت

ترکیبات فرار مختلف به صورت جرم هر ترکیب نشان داده شده است. برای اطلاعات بیشتر در مورد ترکیبات، به جداول ۲ و ۳ مراجعه کنید.

Figure 2- Results of principal component analysis (PCA) for different saffron samples obtained from 2016 and 2017 based on the volatile compounds and content of qualitative compounds.

Volatile compounds are shown as the mass of each compound. See Tables 2 and 3 for more information on the compounds.

## نتیجه گیری

نتایج این مطالعه به وضوح نشان داد که کیفیت زعفران بین نمونه‌های دو سال متوالی به‌طور معنی‌داری تغییر می‌کند. مهم‌ترین تغییرات در محتوای ترکیبات عمده‌ی تشکیل دهنده‌ی ساختار ترکیبات فرار زعفران مشاهده شد. سافرانال، استیک اسید،  $(H_5)2$ -فورانون و بایوجنیک آلدئید فرگمنت در نمونه‌های نگهداری شده از سال ۱۳۹۵ افزایش معنی‌داری نسبت به سال ۱۳۹۶ نشان دادند. این در حالی است میزان عوامل رنگ و طعم کلاله زعفران (به ترتیب میزان کروسین و پیکروکروسین) در این نمونه‌ها در طول زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد. در حالی که نمونه‌های حاصل از سال ۱۳۹۶ از این نظر در گروه زعفران با کیفیت (درجه ۱) قرار گرفتند، نمونه‌های زعفران سال ۱۳۹۵ به خصوص از نظر میزان کروسین در گروه کیفیت با

درجه ۲ درجه بندی شدند که براساس روش ایزو، نشان از افت کیفیت زعفران در طول زمان نگهداری بین دو سال دارد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که براساس پارامترهای مورد بررسی می‌توان به‌خوبی نمونه‌های مختلف زعفران را از یکدیگر متمایز کرد. بنابراین از نتایج این مطالعه می‌توان به‌عنوان شاخصی برای تمایز بین نمونه‌های زعفران حاصل از سال جدید و زعفران نگهداری شده از سال یا سال‌های قبل استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

از پروفیسور Saskia M. van Ruth و دکتر Sara W. Erasmus از دانشگاه واخنینگن هلند، به دلیل کمک و راهنمایی در اجرای این تحقیق، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

- Amanpour, A., Sonmezdag, A.S., Kelebek, H., and Selli, S. 2015. GC-MS-olfactometric characterization of the most aroma-active components in a representative aromatic extract from Iranian saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry* 182: 251-256.
- Bolandi, M., and Ghoddusi, H.B. 2006. Flavour and colour changes during processing and storage of saffron (*Crocus sativus* L.). *Developments in Food Science* 43: 323.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M.R., and Alonso, G.L. 2007. A new approach to saffron aroma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 145-159.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M.R., and Alonso, G.L. 2006. Generation of saffron volatiles by thermal carotenoid degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6825-6834.
- Chaouqi, S., Moratalla-López, N., Lage, M., Lorenzo, C., Alonso, G.L., and Guedira, T. 2018. Effect of drying and storage process on Moroccan saffron quality. *Food Bioscience* 22: 146-153.
- Cossignani, L., Urbani, E., Simonetti, M.S., Maurizi, A., Chiesi, C., and Blasi, F. 2014. Characterisation of secondary metabolites in saffron from central Italy (Cascia, Umbria). *Food Chemistry* 143: 446-451.
- D'Auria, 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.
- Ghanbari, J., Khajoei-Nejad, G., Erasmus, S.W., and van Ruth, S.M. 2019. Identification and characterisation of volatile fingerprints of saffron stigmas and petals using PTR-TOF-MS: Influence of nutritional treatments and corm provenance. *Industrial Crops and Products* 141: 111803.
- Gresta, F., Lombardo, G.M., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2008. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 95-112.
- 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 and Food Chemistry* 52: 4515-4521.
- Lage, M., and Cantrell, C.L. 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.
- Lindinger, W., and Jordan, A. 1998. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): on-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels. *Chemical Society Reviews* 27: 347-375.
- Liu, J., Chen, N., Yang, J., Yang, B., Ouyang, Z., Wu, C., Yuan, Y., Wang, W., and Chen, M. 2018. An integrated approach combining HPLC, GC/MS, NIRS, and chemometrics for the geographical discrimination and commercial categorization of saffron. *Food Chemistry* 253: 284-292.
- Maggi, L., Carmona, M., Zalacain, A., Kanakis, C.D., Anastasaki, E., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., and Alonso, G.L. 2010. Changes in saffron volatile profile according to its storage time. *Food Research International* 43: 1329-

- 1334.
- Masi, E., Taiti, C., Heimler, D., Vignolini, P., Romani, A., and Mancuso, S. 2016. PTR-TOF-MS and HPLC analysis in the characterization of saffron (*Crocus sativus* L.) from Italy and Iran. *Food Chemistry* 192: 75-81.
- Melnyk, J.P., Wang, S., and Marcone, M.F. 2010. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International* 43: 1981-1989.
- Nenadis, N., Heenan, S., Tsimidou, M.Z., and van Ruth, S. 2016. Applicability of PTR-MS in the quality control of saffron. *Food Chemistry* 196: 961-967.
- Shao, Q., Huang, Y., Zhou, A., Guo, H., Zhang, A., and Wang, Y. 2014. Application of response surface methodology to optimise supercritical carbon dioxide extraction of volatile compounds from *Crocus sativus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1430-1436.
- Silvis, I.C.J., Luning, P.A., Klose, N., Jansen, M., and van Ruth, S.M. 2019. Similarities and differences of the volatile profiles of six spices explored by Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry. *Food Chemistry* 271: 318-327.
- Urbani, E., Blasi, F., Chiesi, C., Maurizi, A., and Cossignani, L. 2015. Characterization of volatile fraction of saffron from central Italy (Cascia, Umbria). *International Journal of Food Properties* 18: 2223-2230.

## Changes in Quality and Composition of Volatile Compounds of Saffron Affected by Storage Time in Two Consecutive Years

Jalal Ghanbari<sup>1</sup> and Gholamreza Khajoei-Nejad<sup>2\*</sup>

Submitted: 16 June 2020

Accepted: 13 September 2020

Ghanbari, J., and Khajoei-Nejad, Gh. 2021. Changes in quality and composition of volatile compounds of saffron affected by storage time in two consecutive years. *Saffron Agronomy & Technology*, 9(1): 29-41.

### Abstract

Modifications in saffron quality characteristics due to storage time between samples harvested from two consecutive years have not been studied well. For this purpose, saffron samples harvested from 2016 and 2017 were analyzed using proton transfer reaction-time of flight-mass spectrometry (PTR-TOF-MS) and ISO 3632 trade standard procedures to determine volatile compounds as well as crocin and picrocrocin contents, respectively. The results of volatile organic compounds (VOCs) analysis revealed that 11 main compounds, including safranal, acetic acid, 2(5H)-furanone, isobutanal, biogenic aldehyde fragment, 4-ketoisophorone, acetaldehyde, butyrolactone, acetone/propanal, methanol, and isophorone were responsible for the overall VOCs profile of saffron, as accounted for more than 80% of the identified VOCs. Comparisons between samples stored from two years showed that safranal, acetic acid, 2(5H)-furanone, biogenic aldehyde fragment, and butyrolactone compounds were significantly increased for samples stored from 2016 (between 56-82 percent) compared with the samples obtained from 2017. On the contrary, isophorone isomers contents as safranal precursors decreased their contents relatively. Similarly, crocin and picrocrocin contents measured by ISO method differed significantly between samples of two studied years. For all the studied samples, color and flavor factors of saffron reduced by 20 and 14% on the average for samples stored from 2016 in comparison with samples obtained from 2017, respectively. According to results of principal component analysis, change in crocin, picrocrocin, and main volatile compounds of saffron, including safranal, acetic acid, 2(5H)-furanone, isobutanal, and isophorone could be considered as an indicator for distinguishing the current year's harvested samples from the samples stored since previous years.

**Keywords:** Crocin, Picrocrocin, Saffron stigma, Safranal, Volatile compounds.

1 - PhD student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

2 - Associate Professor of Agronomy, Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.

(\* - Corresponding author Email: khajoei@uk.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2020.235429.1400