Saffron Agronomy & Technology
Vol. 9, No. 2, Summer 2021, P. 177-191

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰ ص. ۱۹۱-۱۷۷

مقاله پژوهشی

مقایسه‌ی پروفایل متابولیکی زعفران‌های مناطق مختلف استان خراسان رضوی بر اساس خاستگاه جغرافیایی آنها با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی–طیف سنجی جرمی (GC-MS)

سید محسن موسوی[۱]، مریم خوشکام[۲*] و جواد فیضی[۳]

تاریخ دریافت: ۵ شهریور۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۷ اردیبهشت ۱۴۰۰

موسوی، س.ح.، خوشکام، م.، و فیضی، ج. ۱۴۰۰. مقایسه‌ی پروفایل متابولیکی زعفران‌های مناطق مختلف استان خراسان رضوی بر اساس خاستگاه جغرافیایی آنها با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی–طیف سنجی جرمی (GC-MS). زراعت و فناوری زعفران، ۹(۲): ۱۹۱–۱۷۷.

چکیده

زعفران گیاهی از گونه *کروکوس ساتیووس* از ارزشمندترین گیاهان بومی ایران بوده و در جهان به عنوان گران قیمت‌ترین ادویه و طلای سرخ مشهور شده است. کلاله زعفران حاوی سه ترکیب اصلی کروسین (رنگدانه های کاروتنوئیدی محلول در آب)، پیکروکروسین (گلیکوزید تلخ مزه) و سافرانال (جزء اصلی مواد فرار معطر زعفران) می‌باشد. این مطالعه به منظور تعیین و مقایسه‌ی متابولیت‌های موجود در انواع زعفران‌های متفاوت براساس خاستگاه جغرافیایی آن‌ها با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی–طیف سنجی جرمی انجام شد و ۱۲ متابولیت فرار مربوط به زعفران‌های هفت منطقه مختلف خراسان رضوی مورد مقایسه قرار گرفتند. این مناطق عبارت بودند از تایباد، نیشابور،تربت حیدریه، تربت جام، زاوه، رشتخوار و کاشمر. نتایج تجزیه و تحلیل‌های آماری (تست آنالیز واریانس ANOVA و به دنبال آن تست دانکن) نشان دادند که در سطح اطمینان ۹۵٪ این نمونه‌ها در سطح پنج متابولیت فرار در این مناطق تفاوت معنی‌دار داشته و همین امر باعث تمایز زعفران مناطق مختلف از یکدیگر شده است. این متابولیت‌های فرار شامل سافرانال، مگاستیگما ۴-۶-۸ ترین، آلفا گایین، ایکوزان و ویتأمین E می باشند که مسئول عطر و خواص درمانی زعفران هستند. نتایج این مطالعه نشان می دهد که علیرغم شباهت در محتویات متابولیکی زعفران ها تفاوت‌های معناداری بین سطح برخی ازمتابولیت‌ها وجود دارد اگرچه این مناطق نزدیک به هم هستند. این تفاوت‌ها نشان می‌دهد که این زعفران‌ها می توانند به اهداف مختلفی شامل صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی استفاده شوند. زعفران تربت جام مناسب برای استفاده در صنایع غذایی می‌باشد چون متابولیت مسئول عطر در آن غلظت بالایی دارد و زعفران منطقه تایباد مناسب برای مصرف در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی می‌باشد. کیفیت زعفران کاشمر از بقیه پایین‌تر است.

کلمات کلیدی: خاستگاه جغرافیایی، متابولیت‌های فرار زعفران، کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- استادیارگروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳- استادیار گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: khoshkam@uma.ac.ir)

DOI: 10.22048/JSAT.2021.245568.1408

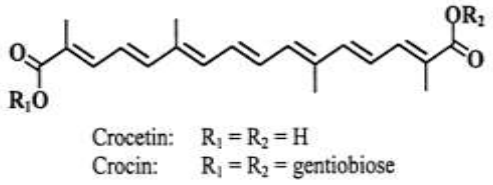
مقدمه

زعفران گیاهی با نام علمی *کروکوس ساتیووس* از خانواده زنبقیان می‌باشد. این گیاه دارای پیاز کوچک، تقریبا کروی، و پوشیده شده از غشای قهوه‌ای رنگ است که به این پیاز از نظر گیاه شناسی بنه یا کرم گفته می‌شود. زعفران، در واقع کلاله‌ی مادگی خشک شده است و گل زعفران بذر تولید نمی‌کند. به همین دلیل تکثیر زعفران به وسیله پیاز انجام می‌شود (Behnia, 1991a; b). این گیاه بطور وسیع و گسترده در مناطق مرکزی و شرقی استان خراسان در شهرستان‌های تربت جام، تایباد، باخرز، گناباد، سبزوار، ششتمد، نیشابور، بجستان، کاشمر، خلیل‌آباد و کوهسرخ و در قسمت خراسان جنوبی در شهرستان‌های تربت حیدریه، زاوه، قاینات، فردوس، بشرویه، سرایان و بیرجند و به تازگی در استان‌های اصفهان (نطنز) فارس، کرمان، سمنان (شاهرود)، لرستان، قزوین، اردبیل و استان آذربایجان شرقی کشت می‌شود.

بررسی ترکیبات شیمیایی که بر روی کلاله زعفران تاکنون انجام گرفته به کشف بیش از ۱۵۰ متابولیت مختلف منجر شده است. زعفران دارای ترکیبات شیمیایی متنوعی است از جمله: کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی، موسیلاژها، ویتأمین‌ها (بویژه ریبوفلاوین و تیامین) رنگدانه‌ها شامل کروسین، آنتوسیانین، کاروتن، لیکوپن، زیگزانتین و یک اسانس معطر ترپنیک به نام سافرانال، و مواد طعم دهنده (پیکروکروسین) است (Winterhalter & Straubinger, 2000; Baba et al., 2015).

زعفران‌های موجود در بازار از نظر نوع رنگدانه‌ها، به دو دسته‌ی طبیعی و غیرطبیعی تقسیم می‌شوند. رنگدانه‌های طبیعی زعفران، از گروه کاروتنوئیدها می‌باشد و به مقدار ناچیزی از رنگدانه های دیگر همانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین تشکیل شده است (Sampathu et al., 1984; Ochiai et al., 2007; Srivastava et al., 2010; Babaei et al., 2014; Bathaie et al., 2014; Heidarbeigi et al., 2015; Guijarro-Díez et al., 2017; Barani & Tajik, 2019).

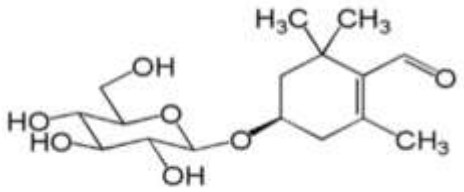
اصلی‌ترین عامل ایجاد قدرت رنگی در زعفران ترکیبی بنام کروسین به فرمول شیمیایی $C_{44}H_{64}O_{24}$ می‌باشد. کروسین به آسانی در آب حل می‌شود و این حلالیت یکی از دلایل کاربرد وسیع آن به عنوان رنگ دهنده در مواد غذایی و دارویی می‌باشد. این ماده توسط سولومان و کاررار به شکل کریستال برای اولین بار بدست آمد (Sampathu et al., 1984) که ساختار شیمیایی آن در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- ساختار شیمیایی کروسین و کروستین با فرمول ($C_{44}H_{64}O_{24}$)

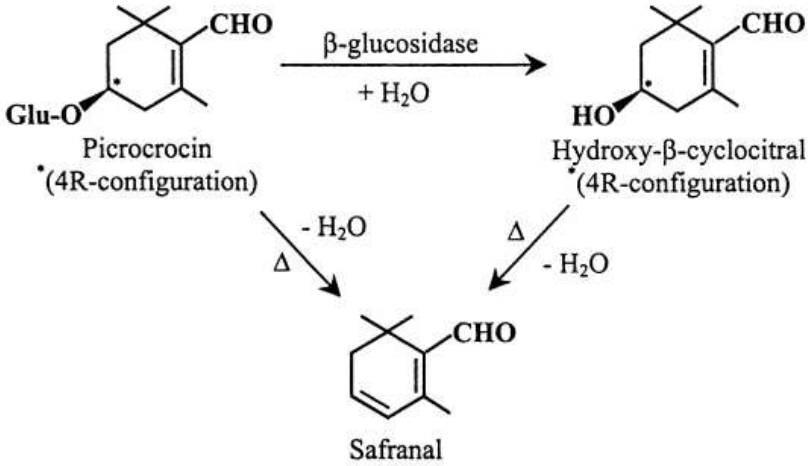
Figure 1- Chemical structure of Crocin and Crocetin with $C_{44}H_{64}O_{24}$ formula (Cadwallader, 2001).

عمده‌ترین ترکیب ایجاد کننده طعم تلخ در زعفران گلیکوزیدی بنام پیکروکروسین با فرمول شیمیایی $C_{16}H_{26}O_7$ است. که مقدار آن در زعفران تازه به ۴ درصد می رسد پیکروکروسین به مرور تجزیه می‌شود و از شدت تلخی آن کاسته می‌شود که از طریق هیدرولیز اسید، گلوکز و آلدئیدی بنام سافرانال تولید می‌شود (Sampathu et al., 1984) که ساختار شیمیایی آن در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- ساختار شیمیایی پیکرو کروسین با فرمول ($C_{16}H_{26}O_7$)
Figure 2- Chemical structure of Picocrocin with $C_{16}H_{26}O_7$ formula (Cadwallader, 2001).

عطر و رایحه قوی زعفران مربوط به روغن‌های معطر و فرار موجود در کلاله است. سافرانال مهم‌ترین ترکیب عطری در روغن‌های فرار زعفران بشمار می‌رود که حدود ٪۶۰ از ترکیبات فرار زعفران را تشکیل می‌دهد. این ماده روغنی در سال ۱۹۳۳ میلادی توسط کوهن و وینتراستین کشف گردید که با توجه به فرار بودن این اسانس روغنی، به صورت تجاری قابل عرضه نیست (Cadwallader, 2001). واکنش شیمیایی تشکیل سافرانال از پیکروکروسین در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- واکنش شیمیایی تشکیل سافرانال
Figure 3- Chemical reaction of safranal formation (Cadwallader, 2001).

انواع مختلفی از تکنیک‌های کروماتوگرافی برای آنالیز زعفران وجود دارد که شامل کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی لایه‌ای نازک، کروماتوگرافی مایع و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است (Amanpour et al., 2018). اخیراً، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با فاز معکوس (RP-HPLC)، مجهز به یک آشکارساز UV-Vis یا آشکارساز UV-Vis DAD برای ترکیبات غیرفرار زعفران مورد استفاده قرار گرفته است (Caballero-Ortega et al., 2007) و کروماتوگرافی گازی (GC) ، با یک دتکتور طیف سنج جرمی (MS) برای ترکیبات فرار زعفران مورد استفاده قرار گرفته است (Narasimhan et al., 1992). تکنیک GC معمولاً برای تجزیه و تحلیل ترکیبات فراری که از نظر حرارتی پایدار هستند مناسب است (Carmona et al., 2006; Ochiai et al., 2007; Anastasaki et al., Zarghami & Heinz, 2009; Amanpour et al., 2018 1971; Rödel & Petrzika, 1991; Grosch, 1993; Carmona et al., 2007a; Carmona et al., ;Tarantilis et al., 1995; Gazdag, 2000; de la 2007b

Torre-Carbot et al., 2005; Caballero-Ortega et al., 2007; Lage & Cantrell, 2009; Amanpour et al., 2018; D'Archivio et al., 2018; Barani & Tajik, 2019; Pfander & Schurtenberger, 1982; Iborra et al., 1992; Sujata et al., 1992a; Sujata et al., 1992b; Castellar et al., 1993; Corti et al., 1996; Lozano et al., 1999; Kamaraki Farahani et al., 2005; Montoro et al., 2008; Sánchez et al., 2008; Pathan et al., 2010; Sabatino et al., 2011; Sereshti et al., 2018). با توجه به اینکه روش‌های کروماتوگرافی از روش‌های بسیار مهم در آنالیزهای کیفی و کمی زعفران می‌باشند، در این مطالعه ۸۹ نمونه زعفران از هفت منطقه مختلف از استان خراسان رضوی با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی ارزیابی قرار گرفتند. هدف از این مطالعه مقایسه‌ی کیفی بین متابولیت‌های فرار زعفران شهرهای مختلف بوده است. لذا پس از ثبت طیف نمونه‌های مورد نظر، ۱۲ متابولیتی که بیشترین فراوانی را در داده‌های GC/MS داشتند، در شهرهای مختلف مقایسه شدند. برای اینکه معنادار بودن سطح این متابولیت‌ها در شهرهای مختلف بررسی شود ابتدا از تست آماری آنالیز واریانس ANOVA استفاده شد. با استفاده از این تست مشاهده شد که پنج متابولیت از ۱۲ متابولیت از همه مهم‌تر هستند و بشترین تفاوت را دارند. لذا در ادامه پروفایل متابولیکی این پنج متابولیت که شامل سافرانال) مگاستیگما ۴-۶-۸-ترین، α-گایین، ایکوزان و ویتأمین E بودند و با استفاده از تست آماری دانکن مقایسه شدند. تست آماری دانکن در واقع تست مقایسه میانگین‌ها می‌باشد و وقتی استفاده می‌شود که لازم است چندین میانگین در گروه‌های مختلف باید با یکدیگر مقایسه شوند (Duncan, 1955; Bewick et al., 2004).

مواد و روش‌ها

جمع آوری و آماده سازی نمونه‌ها

در این تحقیق ۸۹ نمونه از ۷ منطقه در استان خراسان رضوی، شهرهای کاشمر، تایباد، تربت جام ،تربت حیدریه، زاوه، نیشابور و رشتخوار برای تعیین سطح متابولیت‌های فرار زعفران جمع آوری شد و بعد از کد گذاری نمونه‌های زعفران، این نمونه ها درون یک ظرف در بسته در محیط تاریک قرار داده شدند. انتخاب نمونه‌ها در این آزمایش کاملاً تصادفی بوده و تعداد نمونه‌ها از هر شهر متفاوت است. به عنوان مثال تعداد نمونه‌های کاشمر ۹، تایباد ۱۴، تربت جام ۱۰،تربت حیدریه ۱۲ ،زاوه، ۱۲ نیشابور ۱۷ و رشتخوار ۱۵ نمونه بودند. در این مطالعه فاکتور مورد مطالعه خاستگاه جغرافیایی بوده که تعداد آن هفت شهر می‌باشد و تکرار تعداد نمونه‌ها از هر شهر می‌باشد که متفاوت است.

مراحل آماده سازی نمونه

در ابتدا نمونه‌های زعفران با استفاده از یک هاون چینی آسیاب شده و به صورت پودر درآمدند و سپس مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از هر یک از این نمونه‌های زعفران با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شد و درون یک ظرف تیره رنگ درب دار قرار گرفت.

سپس نمونه زعفران آماده شده طی دو مرحله با حلال دی اتیل اتر استخراج شد. استخراج با استفاده از یک حمام اولتراسونیک در فرکانس ثابت ۳۵ کیلوهرتز و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. به این صورت که به هر نمونه زعفران در هر بار ۵ میلی‌لیتر از حلال دی اتیل اتر اضافه کرده و سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه درون حمام اولتراسونیک با دمای ثابت ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارگرفتند. بعد از اتمام این مدت عصاره‌ی استخراج شده‌ی زعفران به درون ظرف دیگری انتقال داده شد و دوباره همین روش با ۵ میلی‌لیتر حلال دی اتیل اتر و استخراج توسط حمام التراسونیک تکرار شد. بعد از پایان مدت اولتراسونیک، عصاره استخراج شده به فاز آلی را به عصاره‌ی گرفته شده از استخراج اول اضافه کرده که حجم عصاره‌ی

نهایی در حدود ۱۰ میلی‌لیتر بدست آمد. در این مرحله برای تغلیظ عصاره‌ی آلی بدست آمده از مرحله‌ی استخراج، با استفاده از دستگاه تبخیر روتاری با دمای حمام آب ۲۰ درجه‌ی سانتی-گراد حجم عصاره‌ی زعفران به $1/3$ تغلیظ شد. با اضافه کردن مقدار کمی از سولفات منیزیم انیدرید به عصاره تغلیظ شده در مرحله قبل، با استفاده از یک کاغذ صافی به عنوان فیلتر، نمونه ها صاف و خالص گردید و آماده تزریق به دستگاه GC-MS شد (Anastasaki et al., 2009).

طیف گیری با استفاده از GC-MS

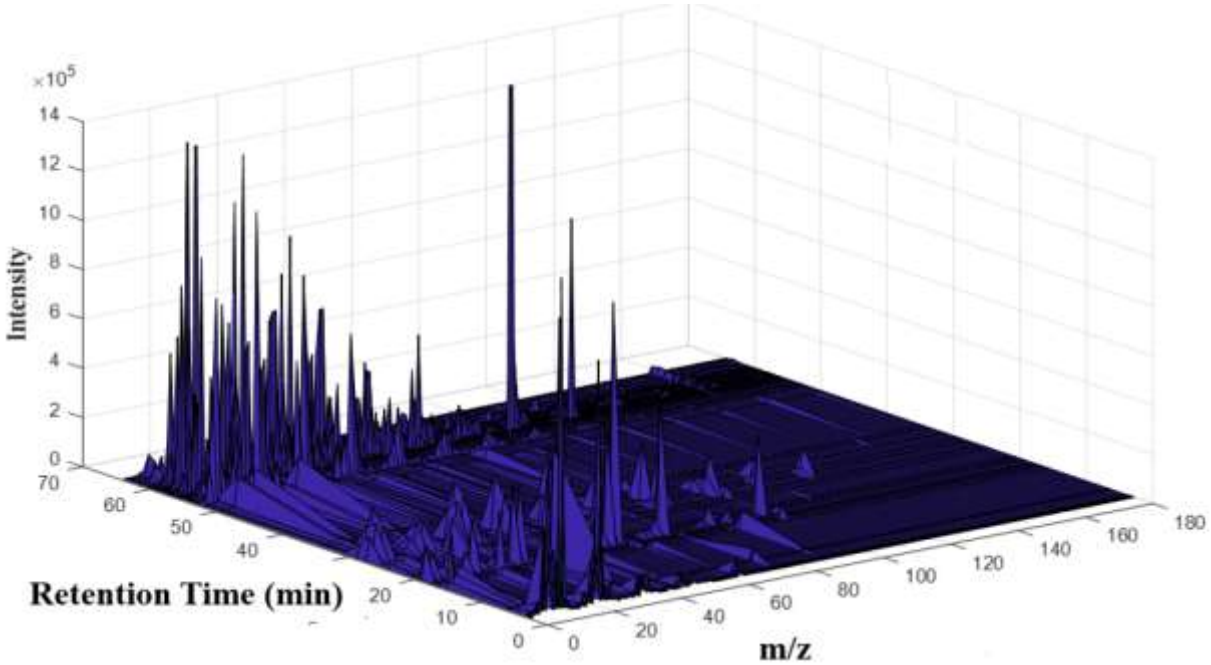
کروماتوگرافی گازی مدل (HP-7890B (Agilent Technologies USA)، مجهز به یک آشکارساز جرمی (MSD) مدل (HP-5977A (Agilent Technologies USA)، با انرژی یونش (۷۰ الکترون ولت) و یک ستون موییینگی با مشخصات (HP-5MS (5% phenyl dimethyl silxan)، به طول ۳۰ متر ، و قطر ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت (۰/۲۵ میکرومتر) با گاز حامل هلیوم با درصد خلوص ۹۹/۹۹ درصد با سرعت فلو ۱ میلی لیتر در دقیقه برای تجزیه و تحلیل عصاره‌ی آلی زعفران استفاده شد. برنامه دمایی که در این روش استفاده شد به این صورت بود که دمای ستون در ابتدا به مدت ۳ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد نگه داشته شد ، سپس به تدریج با سرعت ۳ درجه‌ی سانتیگراد در دقیقه به ۱۸۰ درجه‌ی سانتی گراد افزایش یافت و در نهایت با سرعت ۱۵ درجه‌ی سانتیگراد در دقیقه به ۲۵۰ درجه‌ی سانتیگراد رسید و برای ۵ دقیقه نگه داشته شد. دمای انژکتور و دتکتور به ترتیب ۲۲۰ و ۲۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین شده بود. روش کار به این صورت است که با استفاده از سرنگ میکرو تزریق همیلتون با حجم تزریقی ۱ میکرولیتر از نمونه‌ی زعفران برداشته شد و به صورت دستی و روش مستقیم در قسمت پورت تزریق دستگاه GC در حالت Splitelesse تزریق شد. این آزمایش برای هر نمونه حداقل دو بار تکرار شد و در صورت عدم تطابق داده‌ها، آزمایش تا حد حصول اطمینان به تکرارپذیری نتایج، تکرار شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از ثبت داده های GC/MS نمونه های زعفران، این داده‌ها وارد نرم‌افزار (The Mathworks, Inc.Natick, MA, USA) MATLAB R2018a شده و پردازش و آنالیز شدند (Chen et al., 2014; Han et al., 2017). به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج از تست آنالیز واریانس چند فاکتوری ANOVAn استفاده شد و معنادار بودن تفاوت غلظت‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ بر اساس p-value تصمیم‌گیری شد. در ادامه مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از تست آماری دانکن در محیط MATLAB بر روی داده ها انجام شد.

نتایج و بحث

شکل ۴ طیف GC/MS حاصل از یک نمونه زعفران را نشان می‌دهد. در این مطالعه برای هر نمونه یک طیف GC/MS مشابه این شکل به دست می‌آید. این داده ها سه بعدی می‌باشند یعنی به ازای یک نمونه یک ماتریس داده ثبت می‌گردد که از یک بعد داده بر حسب زمان بازداری و از بعد دیگر بر اساس نسبت جرم به بار می‌باشد.نمونه‌های زعفران جدا شده همگی متعلق به یک نوع گونه‌ی زعفران از مناطق مختلف استان خراسان رضوی بودند که چون این مناطق ممکن است از نظر ترکیب خاک ،میزان و نوع املاح مربوط به آن متفاوت باشند لذا انتظار می‌رود که زعفران‌های به عمل آمده در این مناطق با یکدیگر تفاوت داشته باشند.



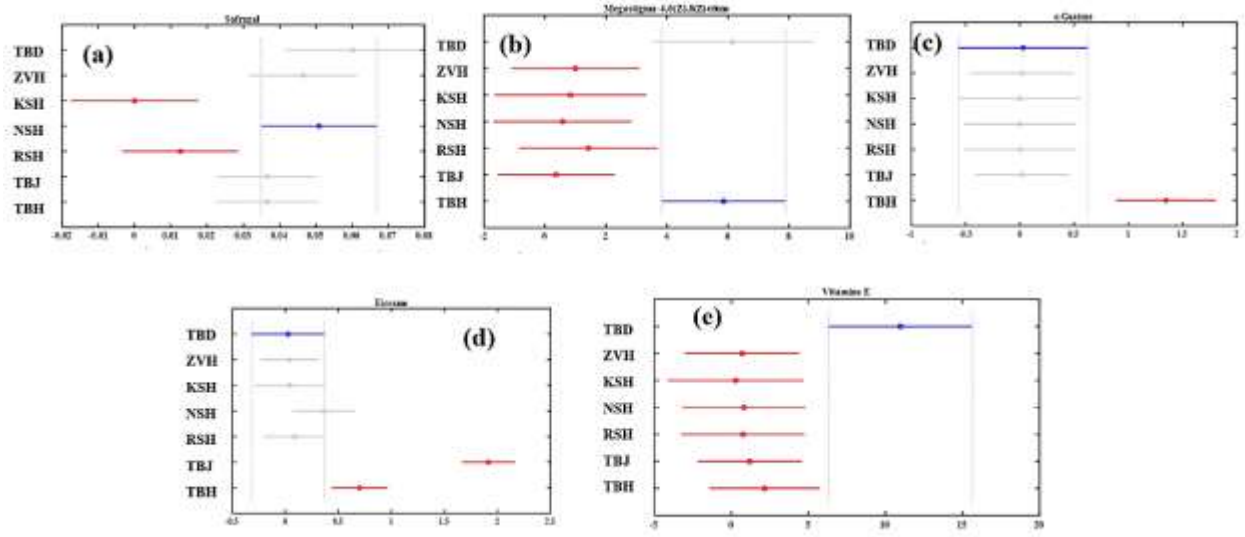
شکل ۴- طیف GC/MS حاصل از یک نمونه‌ی زعفران از تربت حیدریه

در این طیف سه بعدی یک محور مربوط به زمان بازداری، محور دیگر مربوط به نسبت جرم به بار و محور سوم نشانگر شدت داده می‌باشد. در صورتیکه از جهت زمان بازداری، داده ها مشاهده شوند، طیف کروماتوگرام مجموع (Total integrated chromatogram, TIC) و در صورتیکه نمای طیف سه بعدی از جهت نسبت جرم به بار مشاهده شود طیف جرمی نمونه در همه زمان‌ها دیده می‌شود.

Figure 4- The GC/MS spectra from one saffron sample from Torbat Heydarieh.

In this three dimensional spectra one axis is related to retention time, the second axis is related to mass to charge ratio and the third axis is related to intensity. If the three dimentional spectra is seen, from retention time dimention, total integrated chromatogram (TIC) and if the three dimentional spectra is seen from mass to charge ratio dimention, mass spectra of sample in all retention times is observable.

در این بخش متابولیت‌های فرار در همه‌ی انواع زعفران‌های مورد بررسی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی تعیین شده و سطح آنها در نمونه های مختلف با توجه به فراوانی آن‌ها در ۷ منطقه متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. متابولیت‌های بدست آمده و زمان بازداری آن‌ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. سطح غلظت ۱۲ متابولیت در این مناطق با یکدیگر مقایسه شد و تفاوت غلظت متابولیت‌ها در شهرهای مختلف از نظر آماری و معنادار بودن این تفاوت غلظت‌ها بررسی شدند. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان دادند که از بین این ۱۲ متابولیت، ۵ متابولیت هستند که سطح غلظت آنها با یکدیگرتفاوت معنادار دارند و۷ تا از ۱۲ متابولیت، تفاوت معنادار ندارند. شکل ۵ نتایج آنالیز دانکن بر روی میانگین سطح هریک از این پنج متابولیت در شهرهای مختلف را نشان می‌دهد. هفت متابولیت دیگر هیچ تفاوتی با یکدیگر نداشته و در این مقاله نشان داده نشده است. لذا در ادامه فقط روی متابولیت‌هایی که سطح آن‌ها با یکدیگر تفاوت معنادار دارند و درواقع عامل تمایز بین این زعفران ها هستند، بحث خواهد شد. این پنج متابولیت عبارتند از سافرانال، مگاستیکما -۴-۶-۸-ترین، α-گائین، ایکوزان و ویتأمین E.



شکل ۵- بررسی معنادار بودن سطح متابولیت‌های a) سافرانال ، b) مگاستیگما -۴-۶-۸- ، α (c-گائین d) ایکوزان و e) ویتأمین E در شهرهای مختلف

خطوط قرمز بیانگر شهرهایی هستند که در آن سطح متابولیت مورد نظر با سطح همان متابولیت در سایر شهرها که با خطوط آبی مشخص شده اند تفاوت معنی دار دارد.

Figure 5- Investigation of significance of metabolite's level in a) safranal b) Megastigma-4, 6 (Z), 8 (Z)-triene c) α-Guaiene d) Eicosane e) Vitamine E.

The red lines in each figure show the significance difference between these cities with other cities.

شکل ۶ نمودار میله ای برای غلظت متابولیت‌های یافت شده در زعفران را نشان می‌دهد. قسمت a، در این شکل مربوط به سافرانال یکی از متابولیت‌های مهم در زعفران می‌باشد که نقشی مؤثر در عطر زعفران و همچنین در خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن دارد (Assimopoulou et al., 2005; Kanakis et al., 2007; Chen et al., 2008). مطالعات همچنین نشان داده است که سافرانال نقش مؤثری در مهار اثر ژنوتوکسیک متیل متان سولفونات در موش های آزمایشگاهی دارد (Hosseinzadeh & Sadeghnia, 2007). آنالیزهای آماری نشان می‌دهند که در سطح اطمینان ۹۵٪ غلظت متابولیت سافرانال در برخی مناطق تفاوت معناداری با یکدیگر دارند. در بین این هفت منطقه، کمترین مقدار سافرانال مربوط به کاشمر و بیشترین مربوط به زاوه می‌باشد. در سطح اطمینان ۹۵٪ تفاوت سطح سافرانال در زعفران این دو منطقه معنادار بوده و مقدار ($p<0.05$) می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که عطر زعفران در کاشمر بسیار کمتر از زاوه باشد و بنابراین کاربرد این زعفران به عنوان طعم‌دهنده کمتر از زعفران زاوه خواهد بود. از طرفی تفاوت بین زاوه و با تایباد و رشتخوار نیز معنادار بوده است. این در حالیست که بین زعفران رشتخوار و کاشمر تفاوت معناداری وجود ندارد. بنابراین به طور کلی می توان نتیجه گرفت که سطح سافرانال در زعفران کاشمر و رشتخوار به صورت معناداری با سطح سافرانال زاوه فرق دارند. این درحالیست که تفاوت معناداری بین سطح سافرانال در زعفران‌های تربت جام، تربت حیدریه و زاوه وجود ندارد. بنابراین می توان گفت که از نظر سطح سافرانال زعفران این سه منطقه در یک حد و در بالاترین مقدار است.

متابولیت بعدی مگاستیگما ۴-۶-۸- تری ان جزو ترکیبات نورایزوپرنویید ها می‌باشد که در دسته‌ی متابولیت‌های معطر طبقه بندی می‌شوند (Knapp et al., 2001). بیشترین سطح این متابولیت در تربت‌جام و کمترین در تربت‌حیدریه می‌باشد

(شکل ۶b). مقدار $p<0.05$ می‌باشد که در سطح اطمینان ۹۵٪ معنادار است. تایباد و تربت‌جام از نظر سطح این متابولیت با یکدیگر تفاوت معناداری ندارند ولی تفاوت این دو با سایر شهرها معنادار است.

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده موجود در عصاره گیاه *Crocus sativus* L. استخراج شده به روش التراسونیک در یک نمونه از زعفران تربت جام

Table 1- The constituents of saffron samples in essence of saffron with ultra-sonic method in one sample from Torbate Jam

ردیف Number	نام متابولیت Metabolite name	درصد نسبی سطح زیر منحنی Relative peak area %	زمان بازداری Retention time (min)	% احتمال % probability
1	β- ایزوفورن Isophorone-β	0.74%	12.38	94
2	کتو-ایزوفورن Ketoisophorone	0.67%	16.88	97
3	سافرانال Safranal	3.823%	19.64	98
4	۴-هیدروکسی ایزوفورن 4-hydroxyisophorone	1.54%	24.84	83
5	مگاستیگما -۴-۶-۸-ترین Megastigma-4,6(Z),8(Z)-triene	0.56%	25.77	96
6	α-گائین α-Guaiene	0.07%	29.88	99
7	دودکانوئیک اسید Dodecanoic acid	0.08%	35.38	99
8	تترا دکانوئیک اسید Tetradecanoic acid	0.17%	42.40	99
9	پالمتیک اسید Palmitic acid	1.25%	49.84	96
10	اولئیک اسید Oleic Acid	2.12%	52.39	89
11	ایکوزان Eicosane	0.66%	54.99	90
12	ویتأمین E Vitamin E	0.61%	60.64	89

*درصد احتمال میزان شباهت طیف جرمی هر یک از متابولیت‌ها در نمونه با طیف جرمی همان متابولیت در پایگاه داده می‌باشد.

Percent of probability shows the similarity of mass spectra of each metabolites with mass spectra of same metabolites in database.

تفاوت معنادار دیگری در سطح این متابولیت در سایر مناطق دیده نشد.

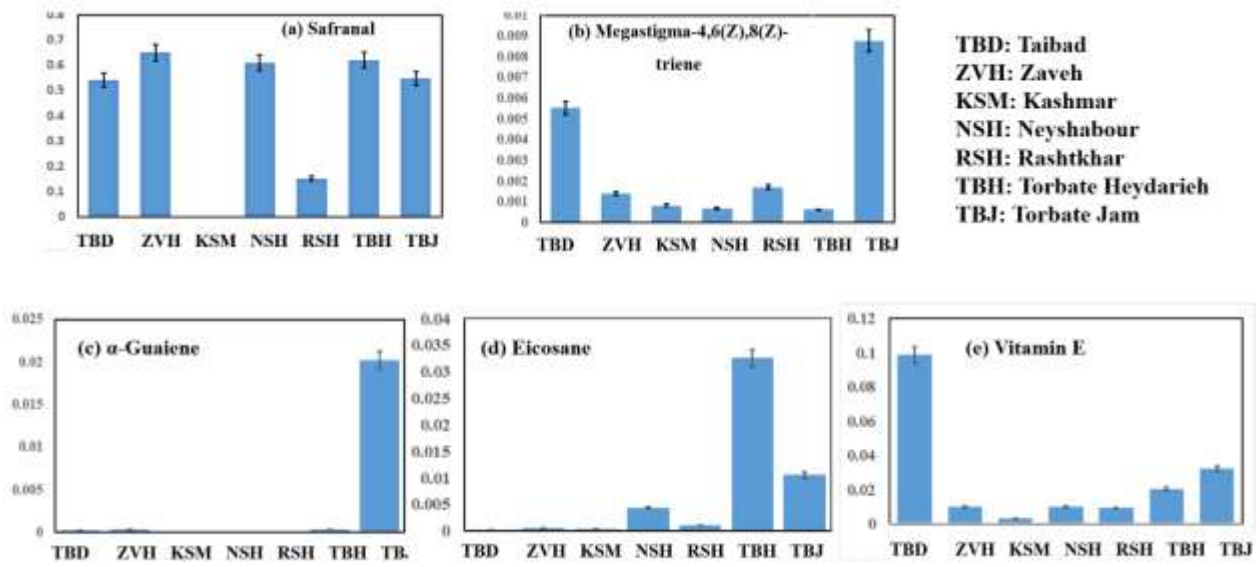
متابولیت بعدی α-گائین ($C_{15}H_{24}$) می‌باشد. این متابولیت یک متابولیت کلیدی مؤثر در بوی فلفل سیاه می‌باشد. در زعفران هم این متابولیت در تندی عطر زعفران تأثیر دارد (Mattivi, 2016). این متابولیت ماده‌ی سازنده‌ی روتندون[۱] می‌باشد (Takase et al., 2015). در واقع α-گائین در طی یک اکسیداسیون تبدیل به روتندون می‌شود که این ترکیب مسئول عطر تند زعفران می‌باشد (Mattivi, 2016). کمترین مقدار این متابولیت در کاشمر و بیشترین مقدار آن در تربت‌جام می‌باشد (شکل ۶c). نتایج آماری تفاوت معنادار این متابولیت‌ها را در این دو منطقه تأیید می‌نماید ($p=0.049$).

متابولیت بعدی ایکوزان می‌باشد. ایکوزان یک آلکان خطی با فرمول C20H42 بوده و از نظر بیولوژیکی یک ترکیب ضد قارچ است (Karanja et al., 2010; Nandhini et al.,

۱- Rotundone

2015). تربت‌جام و سپس تربت‌حیدریه بالاترین غلظت این متابولیت را دارند (شکل ۶d). نتایج آماری تفاوت معناداری بین سطح ایکوزان این دو منطقه نشان نداد ($p>0.05$). از طرفی تفاوت بین غلظت ایکوزان در این دو منطقه با سایر مناطق معنادار بوده است.

آخرین متابولیت ویتأمین E می‌باشد. این ویتأمین به عنوان آنتی‌اکسیدان به بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن کمک می‌کند و سطح انرژی را بالا می‌برد.کمترین مقدار ویتأمین E در کاشمر و بیشترین مقدار در تایباد دیده شد. نتایج آنالیز آماری نشان میدهد که تفاوت معنادار بین سطح ویتأمین E در زعفران تایباد با بقیه‌ی شهرها وجود دارد ($p<0.05$) (شکل ۶e). بر اساس این مطالعه زعفران تایباد از سطح ویتانین E بیشتری برخوردار بوده و این تفاوت معنادار می‌باشد. سطح ویتأمین E در سایر شهرها تفاوت معناداری با هم ندارند. بنابر این نتایج می‌توان گفت که زعفران تایباد برای مصارف آرایشی و یا دارویی مناسب تر از سایر زعفران‌ها می‌باشد.



شکل ۶- نتایج حاصل از مقایسه غلظت متابولیت‌های فرار زعفران در مناطق مختلف

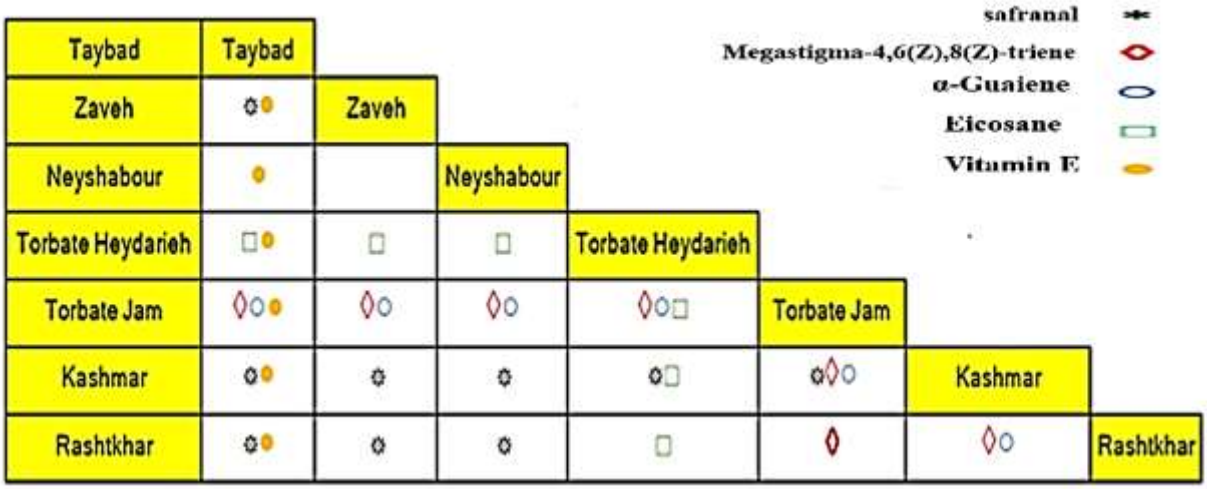
نمودار غلظت متابولیت‌های a) سافرانال ($C_{10}H_{14}O$) ، b) مگاستیگما -۴-۶-۸-ترین ($C_{13}H_{20}$) c) α-گائین ($C_{15}H_{24}$) d) ایکوزان ($C_{20}H_{42}$) e) ویتأمین E ($C_{29}H_{50}O_2$).

Figure 6- The results from comparing the concentrations of volatile metabolites in different areas. Megastigma-4, 6, 8-triene (C13H20) c) α-Guaiene (C15H24) d) Eicosane The concentration of a) safranal $C_{10}H_{14}O$ b) (C20H42) e) Vitamine E C29H50O2.

کیفیت زعفران بر اساس مجموع قدرت رنگ‌دهی، میزان تلخی ناشی از پیکروکروسین و شدت عطر آن به دلیل وجود ترکیبات فرار موجود در آن، ارزیابی می‌شود. در یک مطالعه با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی مایع زعفران سه کشور ایران، هند و روسیه با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج این مطالعه نشان داده است که زعفران ایران از نظر میزان تلخی و زعفران هند از نظر عطر از بقیه بیشتر هستند (Gresta et al., 2008; 2009). همچنین با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز، نشان داده شده است که زعفران کشورهای یونان، ایران، اسپانیا و ایتالیا با یکدیگر تفاوت معناداری داشته که ناشی از تفاوت در متابولیت‌های آن‌ها می‌باشد (Anastasaki et al., 2009). مطالعات زیادی درباره متابولیت‌های ثانویه‌ی زعفران با استفاده

از تکنیک‌های کروماتوگرافی وجود دارد که در آنها به عنوان مثال اثر کودهای بیولوژیک نیتروکسین در میزان متابولیت‌های ثانویه‌ی زعفران (Fadafen et al., 2018)، اثر شرایط آبیاری مرسوم و یک بار آبیاری بر میزان متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران (Sheykholeslami et al., 2020) ، اثر غلظت اسید جیبرلیک و وزن بنه‌ماری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان متابولیت‌های ثانویه‌ی زعفران (Shakeri et al., 2018; Shakeri, 2020) و میزان متابولیت‌های کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در بسته‌بندی‌های مختلف در زعفران‌های ایران به روش کروماتوگرافی مایع پرداخته‌اند (Hoshyar et al., 2010). ولی در هیچ‌کدام از مقالات به شکل آماری میزان متابولیت‌های مختلف زعفران به شکل مطالعه‌ی حاضر بررسی نشده است. تنها در سال ۱۳۹۵، ترکیبات مؤثره و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی زعفران تولید شده در شهرستان‌های کاشمر در استان خراسان و مرند در استان آذربایجان شرقی، با استفاده از تکنیک جذب و رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح پیکروکروسین و سافرانال در زعفران مرند تفاوت معناداری با زعفران کاشمر داشته و از آن بالاتر است (Vakili-ghartavol & Alizadeh Salteh, 2016).

شکل ۷ نتایج کلی مقایسه این پنج متابولیت را در هفت شهر نشان می‌دهد. به صورت کلی زعفران زاوه و نیشابور در سطح این پنج متابولیت تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند. تربت‌جام و تربت‌حیدریه در سطح سه متابولیت مگاستیگما-۴-۶-۸-ترین، سافرانال و α-گائین با یکدیگر تفاوت دارند. سطح مگاستیگما۴-۶-۸-ترین در تربت‌جام با همه‌ی شهرها تفاوت دارد.



شکل ۷- مقایسه کلی متابولیت‌های سافرانال، مگاستیگما-۴-۶-۸ ترین، و α-گائین ، ایکوزان و ویتأمین E در شهرهای مختلف
علامت های داخل جدول نشان دهنده معنی دار بودن سطح متابولیت خاص در آن دو شهر می‌باشد. جهت تعیین معنی دار بودن این تفاوت ها از تست دانکن استفاده شده است.

Figure 7- Total comparison of Safranal, Megastigma-4, 6 (Z), 8 (Z)-triene, α-Guaiene, Ecosane and Vitamin E in different cities.
The symbols inside the table show the significance of metabolites levels in two cities. Duncan test has been used to show the significance difference.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان می‌دهند که زعفران مناطق مختلف ایران علی

رغم شباهت‌های بسیار زیاد، دارای تفاوت‌هایی می‌باشند که همین تفاوت‌ها می‌تواند عامل جدایش زعفران گروه‌های مختلف از یکدیگر باشد. غلظت متابولیت‌های بدست آمده در این مطالعه، غلظت‌های کیفی بوده و نسبت‌های آن به یکدیگر در این ۷ شهر گزارش شده است. با توجه به نتایج غلظت نمونه‌های زعفران به دست آمده می‌توان گفت که زعفران شهر تربت‌جام به دلیل بالا بودن غلظت متابولیت‌های سافرانال، α-گائین، و مگاستیگما-۴-۶-۸-ترین، از کیفیت عطر و طعم بالایی برخوردار است و همچنین نمونه‌ی زعفران تربت‌جام و تربت‌حیدریه و نیشابور به دلیل وجود غلظت بالای متابولیت‌های اولئیک اسید، ایکوزان و نیز بدلیل غلظت بالای اسیدهای چرب موجود در نمونه می‌توان از آن‌ها برای جلوگیری و پیشگیری و کنترل برخی بیماری‌ها در صنایع دارویی استفاده کرد. نمونه‌ی زعفران شهرهای زاوه، نیشابور، تایباد نیز به دلیل غلظت بالای سافرانال داری بو و عطر قوی شناخته شدند و نمونه زعفران شهر تایباد نیز بدلیل بالا بودن غلظت، ویتأمین E، به‌عنوان زعفران دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا شناخته شد و همچنین نمونه زعفران شهرهای کاشمر و رشتخوار در این مطالعه به دلیل پایین بودن غلظت متابولیت‌های گزارش شده به نسبت شهرهای دیگر از مرغوبیت و کیفیت پایین‌تری برخوردار بودند. این نتایج بر اساس تنها ۸۹ نمونه از زعفران شهرهای مختلف استان خراسان رضوی بودند. به نظر می‌رسد که در صورتی که تعداد نمونه‌ها بیشتر باشند، از نظر آماری بهتر می‌توان تصمیم‌گیری نمود.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه‌ی آقای سید محسن موسوی دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد. کلیه مراحل انجام این پروژه در دانشگاه محقق اردبیلی انجام شده است. نویسندگان این مقاله از همه افرادی که به نوعی در پیشبرد این پایان نامه تلاش نموده‌اند به ویژه آقای حسین کمالی مسئول دستگاه GC/MS دانشگاه محقق اردبیلی تشکر می‌نمایند که با دقت فراوان و به نحو احسن این کار را به اتمام رسانیدند.

منابع

Amanpour, A., Kelebek, H., and Selli, S. 2018. GLC/HPLC methods for saffron (*Crocus sativus* L.). In J.M. Mérillon Ramawat K.G. (eds.), Bioactive Molecules in Food. Springer International Publishing, Cham. pp. 1-49.

Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C.P., Carmona, M., Alonso, G.L., and Polissiou, M.G. 2009. Geographical differentiation of saffron by GC–MS/FID and chemometrics. European Food Research and Technology 229: 899-905.

Assimopoulou, A., Sinakos, Z., and Papageorgiou, V. 2005. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 19: 997-1000.

Baba, S.A., Malik, A.H., Wani, Z.A., Mohiuddin, T., Shah, Z., Abbas, N., and Ashraf, N. 2015. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. South African Journal of Botany 99: 80-87.

Babaei, S., Talebi, M., and Bahar, M. 2014. Developing an SCAR and ITS reliable multiplex PCR-based assay for safflower adulterant detection in saffron samples. Food Control 35: 323-328.

Barani, A., and Tajik, H. 2019. Simultaneous determination of saffron and synthetic dyes in ready-to-cook Iranian barbecued chicken by HPLC. International Journal of Food Properties 22: 1608-1614.

Bathaie, S.Z., Farajzade, A., and Hoshyar, R. 2014. A review of the chemistry and uses of crocins and crocetin, the carotenoid natural dyes in saffron, with particular emphasis on applications as colorants including their use as biological stains. Biotechnic and Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission 89: 401-411.

Behnia, M. 1991a. Saffron Cultivation. Tehran University Publication. pp. 112-127. (In Persian).

Behnia, M. 1991b. Saffron: Botany, Cultivation and Production. Tehran: Tehran Univerity Publication. pp. 1-35.

Bewick, V., Cheek, L., and Ball, J. 2004. Statistics review 9: one-way analysis of variance. Crit Care 8: 130-136.

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.

Cadwallader, K.R. 2001. Flavor Chemistry of Saffron. Carotenoid-Derived Aroma Compounds. American Chemical Society. pp. 220-239.

Carmona, M., Martinez, J., Zalacain, A., Rodriguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A., and Alonso, G.L. 2006. Analysis of saffron volatile fraction by TD–GC–MS and e-nose. European Food Research and Technology 223: 96-101.

Carmona, M., Sánchez, A.M., Ferreres, F., Zalacain, A., Tomás-Barberán, F., and Alonso, G.L. 2007a. Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. Food Chemistry 100: 445-450.

Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M., and Alonso, G. 2007b. A new approach to saffron aroma. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 47: 145-159.

Castellar, M., Montijano, H., Manjon, A., and Iborra, J. 1993. Preparative high-performance liquid chromatographic purification of saffron secondary metabolites. Journal of Chromatography A 648: 187-190.

Chen, M., Rao, R.S.P., Zhang, Y., Zhong, C.X., and Thelen, J.J. 2014. A modified data normalization method for GC-MS-based metabolomics to minimize batch variation. SpringerPlus 3: 439.

Chen, Y., Zhang, H., Tian, X., Zhao, C., Cai, L., Liu, Y., Jia, L., Yin, H.X., and Chen, C. 2008. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. Food Chemistry 109: 484-492.

Corti, P., Mazzei, E., Ferri, S., Franchi, G.G., and Dreassi, E. 1996. High Performance thin layer chromatographic quantitative analysis of Picrocrocin and Crocetin, active principles of saffron (*Crocus sativus* L. Iridaceae): A New Method. Phytochemical Analysis 7: 201-203.

D'Archivio, A.A., Di Donato, F., Foschi, M., Maggi, M.A., and Ruggieri, F. 2018. UHPLC analysis of saffron (*Crocus sativus* L.): optimization of separation using chemometrics and detection of minor crocetin esters. Molecules 23: 1851.

de la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A., Lamuela-Raventós, R., and López-Sabater, M. 2005. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4331-4340.

Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F

tests. Biometrics 11: 1-42.

Fadafen, A.O., Aminifard, M., Moradinezhad, F., and Behdani, M. 2018. The Effect of biological fertilizer nitroxin on Secound Metabolits of Saffron (*Crocus sativus* L.). Horticultural Plants Nutrition 1: 17-28.

Gazdag, M. 2000. 2.7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Related Techniques 2.7. 1. Separation, Detection and Determination of Impurities by HPLC. Identification and Determination of Impurities in Drugs. 210p.

Gresta, F., Lombardo, G., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2008. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. Agronomy for Sustainable Development 28: 95-112.

Gresta, F., Lombardo, G., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2009. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems: a review. Sustainable Agriculture 355-376.

Grosch, W. 1993. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. Trends in Food Science and Technology 4: 68-73.

Guijarro-Díez, M., Castro-Puyana, M., Crego, A.L., and Marina, M.L. 2017. A novel method for the quality control of saffron through the simultaneous analysis of authenticity and adulteration markers by liquid chromatography-(quadrupole-time of flight)-mass spectrometry. Food Chemistry 228: 403-410.

Han, T.L., Yang, Y., Zhang, H., and Law, K.P., 2017. Analytical challenges of untargeted GC-MS-based metabolomics and the critical issues in selecting the data processing strategy. F1000 Research 6: 967-983

Heidarbeigi, K., Mohtasebi, S.S., Foroughirad, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Rafiee, S., and Rezaei, K. 2015. Detection of adulteration in saffron samples using electronic nose. International Journal of Food Properties 18: 1391-1401.

Hoshyar, R., Bathaie, S.Z., and Etemadikia, B. 2010. Quantitative and comparative analysis of major metabolites (crocin, picrocrocin and safranal) in different packages of Iranian saffron by HPLC. Pathobiology Research 13: 63-71.

Hosseinzadeh, H., and Sadeghnia, H.R. 2007. Effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus* (Saffron), on methyl methanesulfonate (MMS)–induced DNA damage in mouse organs: an alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. DNA and Cell Biology 26: 841-846.

Iborra, J.O.L., Castellar, M.R., CÁnovas, M., and ManjÓn, A. 1992. TLC preparative purification of picrocrocin, HTCC and crocin from saffron. Journal of Food Science 57: 714-716.

Kamaraki Farahani, A.A.F., Baghaei, P., Rezaei, M.B., Jaymand, K., 2005. Methodes for the analysis of carotenoides (crocins and crocetin of saffron) using thin layer chromatography (tlc). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 20: 407-416. (In Persian with English Summary)

Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Tajmir-Riahi, H.A., and Polissiou, M.G. 2007. Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: stability and antioxidative properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 970-977.

Karanja, E., Boga, H., Muigai, A., Wamunyokoli, F., Kinyua, J., and Nonoh, J. 2010. Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected novel Streptomyces species isolated from selected Kenyan national parks. JKUAT Annual Scientific Conference Proceedings. pp. 51-80.

Knapp, H., Straubinger, M., Stingl, C., and Winterhalter, P. 2001. Analysis of Norisoprenoid Aroma Precursors. Carotenoid-Derived Aroma Compounds. American Chemical Society. pp. 20-35.

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.

Lozano, P., Castellar, M., Simancas, M., and Iborra, J. 1999. A quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. Journal of Chromatography A 830: 477-483.

Mattivi, F. 2016. Key enzymes behind black pepper aroma in wines. Journal of Experimental Botany 67: 555-557.

Montoro, P., Tuberoso, C.I., Maldini, M., Cabras, P., and Pizza, C., 2008. Qualitative profile and quantitative determination of flavonoids from *Crocus sativus* L. petals by LC-MS/MS. Natural Product Communications 3: 2013-2016.

Nandhini, S.U., Sangareshwari, S., and Lata, K. 2015. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of bioactive constituents from the marine Streptomyces. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 8: 244-246.

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

Ochiai, T., Shimeno, H., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanaka, H., Shoyama, Y., Toda, A., Eyanagi, R., and Soeda, S. 2007. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. Biochimica Biophysica Acta 1770: 578-584.

Pathan, S.A., Alam, S., Jain, G.K., Zaidi, S.M., Akhter, S., Vohora, D., Khar, R.K., and Ahmad, F.J. 2010. Quantitative analysis of safranal in saffron extract and nanoparticle formulation by a validated high-performance thin-layer chromatographic method. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques 21: 219-223.

Pfander, H., and Schurtenberger, H. 1982. Biosynthesis of C20-carotenoids in *Crocus sativus*. Phytochemistry 21: 1039-1042.

Rödel, W., and Petrzika, M., 1991. Analysis of the volatile components of saffron. Journal of High Resolution Chromatography 14: 771-774.

Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M., Belligno, A., Traulo, P., and Gagliano, G. 2011. HPLC/PDA/ESI-MS evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration. Natural Product Communications 6: 1873-1876.

Sampathu, S., Shivashankar, S., Lewis, Y., and Wood, A. 1984. Saffron (*Crocus sativus* Linn.)—Cultivation, processing, chemistry and standardization. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 20: 123-157.

Sánchez, A.M., Carmona, M.A., Ordoudi, S.Z. Tsimidou, M., and Alonso, G.L. 2008. Kinetics of individual crocetin ester degradation in aqueous extracts of saffron (*Crocus sativus* L.) upon thermal treatment in the dark. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 1627-1637.

Sereshti, H., Poursorkh, Z., Aliakbarzadeh, G., Zarre, S., and Ataolahi, S. 2018. An image analysis of TLC patterns for quality control of saffron based on soil salinity effect: A strategy for data (pre)-processing. Food Chemistry 239: 831-839.

Shakeri, m. 2021. Effects of different gibberellic acid levels and corm weight on antioxidant activity and secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Saffron Research. In Press. (In Persian with English Summary)

Shakeri, M., Aminifard, M.H., Behdani, M.A., and Tabatabaei, S.J. 2018. Study of the effect hormone of gibberellic acid and corm weight on vegetative and yield traits of saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Plant Production. (Former Journal of Agricultural Sciences and

Natural Resources) 25: 153-165.

Sheykholeslami, P., Saba, J., Shekari, F., Azimi, M.R., and Maleki, A. 2020. Evaluation of secondary metabolites, total phenol content and antioxidant properties of petal in saffron populations under conventional and once irrigation conditions. Journal of Saffron Agronomy and Technology 8: 231-242. (In Persian with English Summary)

Srivastava, R., Ahmed, H., Dixit, R.K., Dharamveer, and Saraf, S.A. 2010. *Crocus sativus* L.: A comprehensive Review. Pharmacogn Reviews 4: 200-208.

Sujata, V., Ravishankar, G., and Venkataraman, L. 1992a. Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetins, picrocrocin and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography. Journal of Chromatography A 624: 497-502.

Sujata, V., Ravishankar, G.A., and Venkataraman, L.V. 1992b. Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetins, picrocrocin and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography. Journal of Chromatography A 624: 497-502.

Takase, H., Sasaki, K., Shinmori, H., Shinohara, A., Mochizuki, C., Kobayashi, H., Ikoma, G., Saito, H., Matsuo, H., Suzuki, S., and Takata, R. 2015. Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (-)-rotundone. Journal of Experimental Botany 67: 787-798.

Tarantilis, P.A., Tsoupras, G., and Polissiou, M. 1995. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 699: 107-118.

Vakili-ghartavol, M., and Alizadeh Salteh, S. 2016. Comparison between metabolites ant antioxidant activity of saffron (*Crocus sativus* L.) from Kashmar and Marand regions. Saffron Agronomy and Technology 4: 215-224. (In Persian with English Summary)

Winterhalter, P., and Straubinger, M. 2000. Saffron—renewed interest in an ancient spice. Food Reviews International 16: 39-59.

Zarghami, N., and Heinz, D. 1971. Monoterpene aldehydes and isophorone-related compounds of saffron. Phytochemistry 10: 2755-2761.

Comparison of Metabolic Profile of Different Saffron Samples from the Khorasan Razavi Province Based on their Geographical Origin Using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Techniques (GC-MS)

Seyed Mohsen Mousavi[1], Maryam Khoshkam[2]* and Javad Feizi[3]

Submitted: 26 August 2020 **Accepted:** 27 April 2021

Mousavi, S. M., Khoshkam, M., and Feizi, J. 2021. Comparison of Metabolic Profile of Different Saffron Samples from the Khorasan Razavi Province Based on their Geographical Origin Using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Techniques (GC-MS). Saffron Agronomy & Technology, 9(2): 177-191.

Abstract

Saffron is a plant from *Crocus sativus* species, one of the most valuable indigenous herbs in Iran and is known as the most expensive spice and red gold. Saffron stigma consists of three major constituents, including crocin (water-soluble carotenoid pigments), picrocrocin (bitter glycoside tasting), and safranal (the major volatile constituents in saffron aroma). The aim of this study was to determination and comparison of existing metabolites in different types of saffron based on their geographical origin using gas chromatography-mass spectroscopy techniques (GC-MS). Thus, 13 volatile metabolites were determined and compared in different saffron samples from seven different regions of the Khorasan Razavi province. These regions are Taybad, Neyshabour, Torbate Heydarieh, Torbate Jam, Zaveh and Kashmar. The results obtained from statistical analysis (analysis of variance ANOVA followed by Duncan test) show that the level of metabolites were different in different regions and this can be the main reason for their discrimination against each other. These volatile metabolites were safranal, Megastigma-4,6(Z),8(Z)-triene, α-Guaiene, icosane and vitamine E. The results of this study show that in spite of similarities of constituents of these saffron samples, there are significant differences between the levels of metabolites in these regions although these region are close to each other. These differences show that these forms of saffron can be applied for different purposes including pharmaceutical, food, cosmetic and health industries depending on their origin. Saffron of Torbat-e-jam is proper for food industries since it is rich in aroma and that produced in Taibad is proper for pharmaceutical, cosmetic and health industries. The quality of Kashmar saffron is worse than that of other regions.

Keywords: Gas chromatography-Mass spectroscopy, Geographical origin, Volatile saffron metabolites.

1 - Master Student, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili
2 - Assistant Professor of Chemistry, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili,
3 - Assistant Professor of Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Department of Food Quality Control and Safety, Mashhad, Iran.
(*- Corresponding author Email: khoshkam@uma.ac.ir)
DOI: 10.22048/JSAT.2021.245568.1408