



## Biochemical Screening of Saffron Cultivated in Ardabil Province Based on The Quantity of Apo-Carotenoids

Elnaz Ghaffarzadeh<sup>1</sup>, Noraddin Hosseinpour Azad<sup>2\*</sup>, Ali Shahi<sup>2</sup> and Olivia Demurtas<sup>3</sup>

### Article type:

Research Article

### Article history:

Submitted: 11 March 2022

Revised: 23 December 2022

Accepted: 22 January 2023

Available Online: 21 January 2023

### How to cite this article:

Ghaffarzadeh, E., Hosseinpour Azad, N., Shahi, A., and Demurtas, O. 2023. Biochemical Screening of Saffron Cultivated in Ardabil Province Based on The Quantity of Apo-Carotenoids. *Saffron Agronomy & Technology*, 10(4): 391-405.

DOI: 10.22048/jsat.2023.327469.1454

### Abstract

Saffron with the scientific name (*Crocus sativus* L.) belongs to the Iridaceae family. This plant stigma is one of the most expensive spices in the world due to its rich apocarotenoid contents crocin (responsible for color), picrocrocin (bitter taste), and safranal (perfume). For quantitative analysis of these metabolites by Spectroscopy and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC UV-Vis) in Saffron stigma biphasic extract, in purpose the aim of introducing a suitable chemotype of this plant for cultivation in Ardabil province, this study was conducted in an experimental design of randomized complete blocks with three different replications. the data analysis of variance with GenStat ver. 12.1 showed that there were significant differences ( $P < 0.01$ ) between the studied areas based on the apocarotenoid content, and the mean comparisons with the protected Fisher test showed that among the studied areas the chemotype of Onar village in Meshginshahr city Following the quantitative pattern of apocarotenoids, has a relative dominance in comparison with other regions, and on average, the amounts of crocin, picrocrocin, and safranal in the sample volume range are  $0.15 \pm 0.1$ ,  $4.9 \pm 0.11$  and  $1 \pm 0.2$  of dry matter was measured respectively. According to the obtained data, it can be inferred that this region of Ardabil province compared to other regions of this province has the necessary potential to produce this product with high quality.

**Keywords:** Saffron, Spectroscopy, Liquid chromatography, Crocin

1 - M.Sc. of Medicinal Plants, Meshgin shahr Faculty of agriculture, Ardabil, Iran.

2 - Assistant Professor, Department of Plant Science and Medicinal Plants, Meshgin shahr Faculty of agriculture, Ardabil, Iran.

3 - Associated Professor, Department of Agriculture Biotechnology, ENEA Casaccia Research Centre, Roma, Italy.

Corresponding author: [gmlant21@gmail.com](mailto:gmlant21@gmail.com)

Corresponding author: [fa.zaefarian@sanru.ac.ir](mailto:fa.zaefarian@sanru.ac.ir)



## غربالگری بیوشیمیایی گیاه زعفران کشت شده در استان اردبیل بر اساس مقادیر آپوکاروتنوئیدها

الناز غفارزاده<sup>۱</sup>، نورالدین حسین پورآزاد<sup>۲</sup>، علی شاهی قره‌لر<sup>۲</sup>، اولیویا دمورتاس<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۲۰ اسفند ۱۴۰۰

تاریخ بازنگری: ۲ دی ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۲ بهمن ۱۴۰۱

غفارزاده، ا.، حسین پورآزاد، ن.، شاهی قره‌لر، ع.، دمورتاس، ا. ۱۴۰۱. غربالگری بیوشیمیایی گیاه زعفران کشت شده در استان اردبیل بر اساس مقادیر آپوکاروتنوئیدها، زراعت و فناوری زعفران: ۱۰(۴): ۳۹۳-۴۰۵.

### چکیده

گیاه زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) و از خانواده زنیقیان بوده کلاله سه شاخه این گیاه بخاطر داشتن آپوکاروتنوئیدهای کروسین (مسئول رنگ)، پیکروکروسین (طعم تلخ) و سافرانال (عطر) از جمله گران‌ترین ادویه دنیا است. جهت بررسی کمی این متابولیت‌ها به روش اسپکترو سکویی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC UV-Vis) در عصاره دو فازی حاصل شده از کلاله گیاه زعفران، با هدف معرفی تیپ‌های بیوشیمیایی مناسبی از این گیاه جهت کشت در سطح استان اردبیل، تحقیقی بر پایه طرح آزمایشی بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزار آماری GenStat ver. 12.1 نشان داد که بین مناطق مورد مطالعه از نظر مقادیر کمی آپوکاروتنوئیدها اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) وجود داشته و مقایسات میانگین با آزمون فیشر حفاظت شده، ضمن تأیید برتری ارزیابی متابولیتی با کروماتوگرافی مایع، نشان داد در بین مناطق مورد مطالعه کیموتایپ روستای اونار در شهرستان مشگین شهر با تبعیت از الگوی کمی آپوکاروتنوئیدها دارای غالبیت نسبی در مقایسه با دیگر مناطق بوده و بطور میانگین مقادیر ماده کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در واحد حجم نمونه به ترتیب  $1/15 \pm 0/1$ ،  $4/9 \pm 0/13$  و  $1 \pm 0/21$  گرم در هر صد گرم از ماده خشک اندازه‌گیری شد، با توجه به داده‌های حاصله می‌توان استنباط نمود که این منطقه از استان اردبیل، نسبت به دیگر مناطق این استان پتانسیل لازم جهت تولید این محصول را با کیفیت بالا دارا می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** اسپکتروسکوپی، زعفران، کروسین، کروماتوگرافی مایع.

۱- کارشناس ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی.

۲- استاد یار گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی.

۳- دانشیار مرکز ملی تکنولوژی‌های نو، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، رم، ایتالیا.

\*- نویسنده مسئول: [gmplant21@gmail.com](mailto:gmplant21@gmail.com)

## مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی متعلق به خانواده زنبقیان و راسته سوسن سانان بوده (Rajabi et al., 2015)، و تنها گونه‌ای است که برای اهداف خوراکی کشت می‌شود (Ahrazem et al., 2015; Kyriakoudi & Tsimidou, 2018). کاروتنوئیدها به گروهی از ترکیبات ثانویه گیاهی تعلق دارند که برای انسان ضروری محسوب نمی‌شوند، اما برای سلامت انسان مفید هستند، این گروه متابولیتی رنگدانه‌های رنگی لیپوفیلی هستند که در کروموپلاست‌های گیاهی وجود داشته و به بسیاری از گیاهان و میوه‌ها رنگ زرد مایل به قرمز می‌دهند (Demurtas et al., 2018). آپو کاروتنوئیدها به‌طور متابولیکی از شکست اکسیداتیوی ماده زاگزانتین مشتق شده‌اند که طی فرآیندی از مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدها ایجاد می‌گردند، متابولیسم آپو کاروتنوئیدها در گل‌های زعفران بویژه در کروموپلاست‌های زعفران اتفاق می‌افتد، ولی در گیاهان دیگر، این عمل در کلروپلاست‌ها رخ می‌دهد (Hosseinpour Azad et al., 2016). خصوصیات اصلی ارگانولپتیک کلاله‌ها به دلیل تجمع سه دسته آپو کاروتنوئیدی، کروسین، پیکرو کروسین و سافرانال که به ترتیب مسئول رنگ، طعم و رایحه زعفران هستند تعیین می‌شود (Sajjadi et al., 2010; Gomez-Gomez, 2010). پیکرو کروسین با فرمول مولکولی ( $C_{16}H_{26}O_7$ ) یک مونوترپن گلیکوزئیدی بی‌رنگ است که طعم تلخ در زعفران را ایجاد می‌کند (Shahi et al., 2016). سافرانال با فرمول مولکولی ( $C_{10}H_{14}O_2$ )، ترکیب اصلی روغن فرار زعفران و مسئول بو و عطر آن (بیش از ۶۰ درصد اسانس) است که در اثر جدا شدن قند از پیکرو کروسین تولید می‌شود. واکنش جدا شدن قند از پیکرو کروسین معمولاً بعد از خشک شدن کلاله اتفاق می‌افتد، به خاطر همین موضوع کلاله‌های زعفران قبل از خشک

شدن بو و عطر چندان نادرند (Kiani et al., 2016)؛ Azarabadi & Özdemir, 2018). حسین پورآزاد و همکاران (۲۰۱۶)، شناسایی ایزومرهای کروسین و کروستین را در عصاره‌های خام زعفران بوسیله HPLC همراه با فشار یونی یونیزاسیون شیمیایی و طیف سنجی جرمی Orbitrap با وضوح بالا مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنجی جرمی با وضوح بالا ابزاری قدرتمند برای بررسی ترکیبات موجود در منابع گیاهی همچون زعفران است (Hosseinpour Azad et al., 2016). در روش اسپکتروسکوپی طیف جذبی مربوط به متابولیت‌ها در محتویات عصاره سنجیده می‌شود در صورتیکه در کروماتوگرافی مایع متابولیت‌های مختلف پس از تفکیک و جداسازی وارد بخش طیف سنجی جرمی شده که منجر به بالا رفتن دقت شناسایی متابولیت‌های مورد نظر می‌گردد (Sadegh-Zadeh et al., 2011). طی سال‌های اخیر کشت گیاه زعفران در اکثر مناطق استان اردبیل شروع شده است، با توجه به انگیزه فراوان و کورکورانه کشاورزان استان به جایگزینی کشت گیاه زعفران با سایر محصولات کشاورزی، تهیه الگوی کشت مناسب و مشخص نمودن مناطق مناسب کشت در سطح استان بر اساس تغییرات متابولیتی زعفران در هر یک از مناطق کشت شده ضروری به نظر می‌رسد. لازم به ذکر است تاکنون مطالعه‌ای که مبتنی بر غربالگری گیاه زعفران کشت شده در استان اردبیل باشد، انجام نگردیده و به عمل رساندن این تحقیق را بیش از پیش ضروری می‌نمود. در این پروژه به بررسی نوع تغییرات متابولیتی زعفران‌های کشت شده در مناطق مختلف استان اردبیل و غربالگری زعفران‌های کشت شده از نظر کیفیت متابولیت‌های تولید شده با استفاده از روش اسپکتروسکوپی و کروماتوگرافی مایع پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

(2022)، اخیراً این گیاه در اقلیم‌های جغرافیایی متفاوت از کشور ایران بطور زراعی کشت می‌شود. اما بطور عمده کشت این گیاه در مناطق شرقی کشور تمرکز بیشتری یافته است. در این پژوهش سعی بر آن شده، از تیپ‌های بیوشیمیایی مختلف این گیاه که در سطح استان اردبیل بصورت زراعی کشت شده، استفاده گردد که در برگ‌برنده مناطق رویشی با فاصله متفاوت جغرافیایی از هم باشد (جدول ۱).

نمونه‌های کلالة زعفران از مناطق مختلف استان اردبیل به طریق طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار متفاوت که در آن نقاط نمونه‌گیری در هر مزرعه بعنوان بلوک در نظر گرفته شده بود جمع‌آوری و پس از قرارگیری در ظروف تیره به آزمایشگاه منتقل و برای خشک شدن در داخل آن مجهز به تهویه هوا و بدون رو شنایی داخلی با دمای زیر ۲۲ درجه سانتی‌گراد ( $22 > C^{\circ}$ ) بمدت ۷ روز قرار داده شد (Bergomi et al.,

جدول ۱- مشخصات مناطق جمع‌آوری گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.)Table1- Specifications of *Crocus sativus* L. sampling areas

ردیف No.	محل جمع‌آوری Sampling area	استان Province	کد Code	موقعیت جغرافیایی Geographical location N	موقعیت جغرافیایی Geographical location E	ارتفاع محل Altitude (m)
1	هشتجین Hashhtjin	اردبیل Ardabil	SG	37°22'03"	48°19'19"	1250
2	روستای اونار Onar	اردبیل Ardabil	SF	38°27'27"	47°50'35"	1400
3	ارشاق Arshag	اردبیل Ardabil	SD	38°29'55"	47°54'18"	900
4	اردبیل Ardabil	اردبیل Ardabil	SB	38°19'40"	48°26'26"	1200
5	گونه وحشی Wild species	اردبیل Ardabil	SA	38°18'38"	47°28'50"	1600

شده و در داخل یخ سونیک (فرکانس ۴۰ کیلوهرتز سه دوره متوالی ۱۰ ثانیه‌ای با فاصله هر دوره ۳۰ ثانیه) گردیدند. به سو سپانسیون حاصله جهت استخراج متابولیت‌های غیرقطبی مقدار ۱ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد و پس از تکان شدید به مدت ۲۰ دقیقه در حداکثر سرعت سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی همان فاز متانولی بوده که حاوی متابولیت‌های قطبی بوده و فاز پایینی یا فاز کلروفرمی حاوی متابولیت‌های غیرقطبی می‌باشند. پس از جداسازی فازهای قطبی و غیرقطبی، هر کدام از آنها در شرایط خلاء خشک شدند. فاز غیرقطبی خشک شده (حاوی متابولیت‌های غیرقطبی) در ۲ میلی‌لیتر استات اتیل حاوی استاندارد داخلی آلفا توکفرول دی استات با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل گردید. هم‌چنین فاز قطبی خشک شده در ۲

تعین و ویژگی‌های اصلی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی این روش اندازه‌گیری خصوصیات اصلی زعفران را که مرتبط با مقدار پیکروکرو سین، سافرانال و کرو سین است، امکان‌پذیر می‌سازد. اساس روش بر مبنای ثبت تغییرات چگالی نوری عصاره آبی زعفران در طول موج بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر در دمای محیط می‌باشد.

## استخراج عصاره خام

مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از کلالة خشک شده زعفران پودر گردیده و جهت استخراج متابولیت‌های قطبی هم‌چون کرو سین، مقدار ۱ میلی‌لیتر متانول ۵۰ در صد به هر یک از نمونه‌ها اضافه

روش تبخیر در شرایط خلاء، عصاره‌ها تغلیظ شده و در دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شد. در بخش آنالیز با اسپکتروسکوپی (UV-Vis) آنالیز بر اساس استاندارد (ISO 3632-2:2010) با اسپکتروسکوپی پرتو مضاعف (UNIKON 943) شرکت (ایتالیایی کونترن) انجام پذیرفت. حدود ۱۲۵ میلی‌گرم از زعفران خشک شده در ۲۳۰ میلی‌لیتر آب دیونیز خیسانده شده و محتویات جهت ممانعت از اثر تخریبی نور با فویل آلومینیومی پوشانده شده و در حمام آب گرم (22 <درجه سانتی‌گراد) تحت بهم زن مغناطیسی بمدت یک ساعت قرار گرفتند، سپس ۶۰ میلی‌لیتر از عصاره حاصله فیلتر شده و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس از طیف جذبی عصاره آماده شده در محدوده ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری بعمل آمد. بیشترین مقدار جذب به ترتیب در طول موج‌های ۴۴۰، ۲۵۷ و ۳۳۰ نانومتر به ترتیب برای متابولیت‌های کروسین، پیکروکروسین و سافرانال بدست آمد. که با قرارگیری در فرمول‌های زیر به ترتیب شدت رنگ (معیاری برای متابولیت کروسین) (فرمول ۱)، شدت تلخی (پیکروکروسین) (فرمول ۲)، و شدت بو (سافرانال) (فرمول ۳)، حاصل گردید (Kheilare et al., 2019).

$$(1) \quad A_{1\text{cm}}^{1\%}(440 \text{ nm}) = \text{شدت رنگ}$$

$$A_{440\text{nm} \times 2500 / m_w \times W_d(\%)}$$

$$(2) \quad A_{1\text{cm}}^{1\%}(257 \text{ nm}) = \text{شدت تلخی}$$

$$A_{257\text{nm} \times 2500 / m_w \times W_d(\%)}$$

$$(3) \quad A_{1\text{cm}}^{1\%}(330 \text{ nm}) = A_{330\text{nm} \times 2500 / C \times W_d(\%) = \text{شدت بو}$$

$A_{\lambda, \text{max}}$  بیشترین مقدار جذب در طول موج مورد نظر،  $m_w$

وزن خشک زعفران مورد استفاده،  $W_d(\%)$  درصد ماده خشک

در نهایت جهت آنالیز آماری از تجزیه واریانس داده‌ها به طریق طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار متفاوت و مقایسات میانگین به روش فیشر حفاظت شده در سطح احتمال  $(p < 0.01)$  و  $(p < 0.05)$  با استفاده از نرم افزار GenStat ver.12

میلی‌لیتر محلول متانول ۵۰ در صد که حاوی استاندارد داخلی ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از ماده فورمانونین بود بطور کامل حل شد. پس از سانتریفیوژ جداگانه محلول‌های حاوی متابولیت‌های قطبی و غیرقطبی، از فاز مایع آنها به مقدار ۱۰ میکرولیتر در سه تکرار جهت ارزیابی و آنالیز متابولیت‌های کاروتنوئیدی و آپوکاروتنوئیدی در دستگاه کروماتوگرافی تزریق شدند، تمامی محلول‌های استفاده شده با درجه کیفی از شرکت سیگما تهیه گردیدند (Bergomi et al., 2022).

### شرایط دستگاه HPLC Uv/Vis و اسپکتروسکوپی (Uv/Vis)

مشخصات دستگاهی برای اندازه‌گیری پیکروکروسین شامل، دکتور: Uv-Vis (250 nm)، Loop=20 $\mu$ l، ستون=C18 (4.6 $\times$ 250mm); particle size=5 $\mu$ m، سرعت جریان فاز متحرک=1 (ml.min<sup>-1</sup>) و فاز متحرک آب بود. مشخصات دستگاهی برای اندازه‌گیری سافرانال شامل، دکتور: Uv-Vis (278 nm)، Loop=20 $\mu$ l، ستون= آمینی A (4.6 $\times$ 150mm); particle size=5 $\mu$ m، سرعت جریان فاز متحرک=1 (ml.min<sup>-1</sup>) و فاز متحرک ترکیبی از آب ۷۰٪ استونیتریل:۳۰٪ بود و مشخصات دستگاهی برای اندازه‌گیری دارای دکتور: Uv-Vis (440 nm)، Loop=20 $\mu$ l، ستون=C18 (4.6 $\times$ 250mm); particle size=5 $\mu$ m، سرعت جریان فاز متحرک=1 (ml.min<sup>-1</sup>) و فاز متحرک شامل ترکیب آب ۵۰٪ و استونیتریل ۵۰٪ بودند. جداسازی و تفکیک متابولیت‌ها در محتویات عصاره‌های تهیه شده و شناسایی جرم دقیق یون‌های مرتبط با هر یک از آنالیت‌ها بر پایه نسبت جرم به بار ( $m/z$ ) و طبق روش بکار گرفته شده توسط Fantini و همکاران (Fantini et al., 2013) انجام شد. پس از جدا سازی حلال به

انجام شد.

بیان گردیده است و همبستگی بالایی بین منشأ جغرافیایی گیاهان و ترکیبات موثره نشان داده شده است (Bergomi et al., 2022). در تمامی نمونه‌ها به استثنای نمونه وحشی (SA)، کلاله‌های جمع‌آوری شده دارای رنگ قرمز تیره می‌باشند که برداشت کلاله در مرحله گرده‌افشانی را تأیید می‌نمود (شکل ۱) (Demurtas et al., 2018).

## نتایج و بحث

در نظر گرفتن ویژگی‌های محل رویش و موقعیت گیاه در طبیعت از عمده عواملی است که می‌تواند بر میزان اسانس و مواد موثره گیاهان تأثیر وافر داشته باشد. گزارش‌هایی مبنی بر وجود ارتباط بین شرایط رویشگاه بر ترکیبات شیمیایی گیاهان



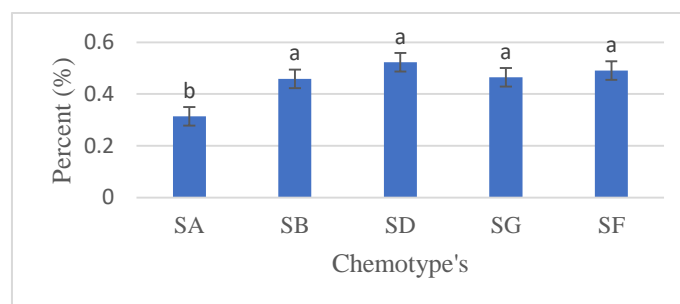
شکل ۱- نمایی از کلاله نمونه‌برداری شده از مناطق مختلف: SA: تیپ بیوشیمیایی وحشی، SD: تیپ بیوشیمیایی ارشق، SB: تیپ بیوشیمیایی اردبیل، SG: تیپ بیوشیمیایی هشتجین و SA: تیپ بیوشیمیایی مشگین‌شهر (روستای اونار)

Figure 1- View of stigmas sampled from different regions (SA: wild chemotype, SD: Arshaq chemotype, SB: Ardabil chemotype, SG: Hashtjin chemotype, and SA: Meshginshahr chemotype (Onar village)).

شده از گونه وحشی (SA)  $(0.3137 \pm 0.01)$ ، برای نمونه اردبیل (SB)  $(0.4587 \pm 0.01)$ ، نمونه ارشق (SD)  $(0.5229 \pm 0.13)$ ، نمونه هشتجین (SG)  $(0.4642 \pm 0.03)$  و نمونه روستای اونار (SF)  $(0.4903 \pm 0.38)$  متغیر بود. بیشترین میزان جذب مربوط به تیپ بیوشیمیایی ارشق و کمترین آن برای تیپ بیوشیمیایی وحشی اندازه‌گیری شد (شکل ۲).

## نتایج اسپکتروسکوپی (UV-Vis)

در این پروژه به منظور مطالعه میزان آپوکاروتنوئیدها در نمونه‌های مختلف از کلاله زعفران جهت آگاهی اولیه از میزان این متابولیت‌ها از روش طیف نورسنجی فرابنفش- مرئی استفاده شد، طیف‌سنجی از مقدار عصاره به حجم ۵۰ میلی‌لیتر حاصل از ۱ گرم از پودر نمونه‌ها، نشان داد که در رقت ۱۰، میانگین جذب در طول موج ۲۵۷ نانومتر (پیکروکروسین) برای عصاره حاصل



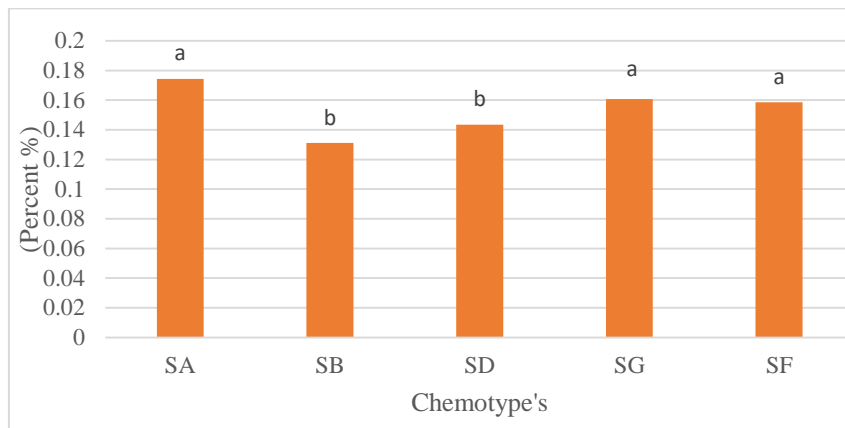
شکل ۲- میانگین جذب در طول موج ۲۵۷ نانومتر (پیکروکروسین)  
Figure 2- Average absorption at 257 nm (Picrocrocin).

برای نمونه اردبیل (SB)  $(0.1311 \pm 0.05)$ ، نمونه ارشق (SD)  $(0.1434 \pm 0.03)$ ، نمونه هشتجین (SG)  $(0.1637 \pm 0.01)$  و

میانگین جذب در طول موج ۳۳۰ نانومتر (سافراناال) برای عصاره حاصل شده از گونه وحشی (SA)  $(0.1744 \pm 0.08)$ ،

کمترین آن برای تیپ بیوشیمیایی اردبیل اندازه‌گیری شد (شکل ۳).

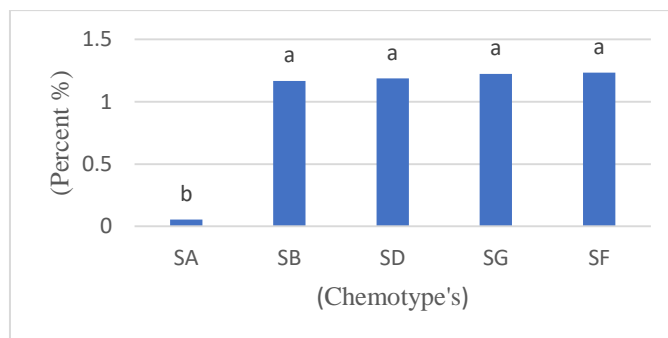
نمونه روستای اونار (SF)  $(0.15853 \pm 0.08)$  متغیر بود (شکل ۳). بیشترین میزان جذب مربوط به تیپ بیوشیمیایی وحشی و



شکل ۳- میانگین جذب در طول موج ۳۳۰ نانومتر (سافرانا)  
 Figure 3- Average absorption at wavelength 330 nm (Safranal).

نمونه روستای اونار (SF)  $(0.2329 \pm 0.08)$  متغیر بود. بیشترین میزان جذب مربوط به تیپ بیوشیمیایی مشگین شهر (روستای اونار) و کمترین آن برای تیپ بیوشیمیایی وحشی اندازه‌گیری شد (شکل ۴).

میانگین جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر (کروسین) برای عصاره حاصل شده از گونه وحشی (SA)  $(0.0563 \pm 0.03)$ ، برای نمونه اردبیل (SB)  $(1.1680 \pm 0.05)$ ، نمونه ارشق (SD)  $(1.1867 \pm 0.03)$ ، نمونه هشتجین (SG)  $(1.2242 \pm 0.01)$  و



شکل ۴- میانگین جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر (کروسین)  
 Figure 4- Average absorption at 440 nm (Crocine).

بیوشیمیایی مورد بررسی اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نتایج مقایسات میانگین به روش فیشر حفاظت شده در سطح احتمال  $(p < 0.01)$  و  $(p < 0.05)$  با استفاده از نرم افزار GenStat ver.12 در جدول ۲ آورده شده است.

داده‌های حاصل از سنجش متابولیت‌ها با روش کروماتوگرافی مایع تجزیه واریانس داده‌های حاصل شده با روش کروماتوگرافی مایع نشان داد از نظر مقادیر کمی آپوکارتنوئیدها در بین تیپ‌های

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش متابولیت‌ها با روش کروماتوگرافی مایع  
Table 2- Analysis of variance of metabolite assay data by Liquid chromatography

S.O.V منابع تغییر	df درجه آزادی	Picrocroci n پیکروکروسین	Saffranal سافراناال	Crocin کروسین
Chemo. تیپ بیوشیمیایی	4	0.457*	0.875*	0.06**
Replicate بلوک	2	10.45 <sup>ns</sup>	17.57 <sup>ns</sup>	14.09 <sup>ns</sup>
Error اشتباه آزمایشی	8	0.043	0.01	0.002
C.V. (%) ضریب تغییرات		11.6%	7.01%	3%

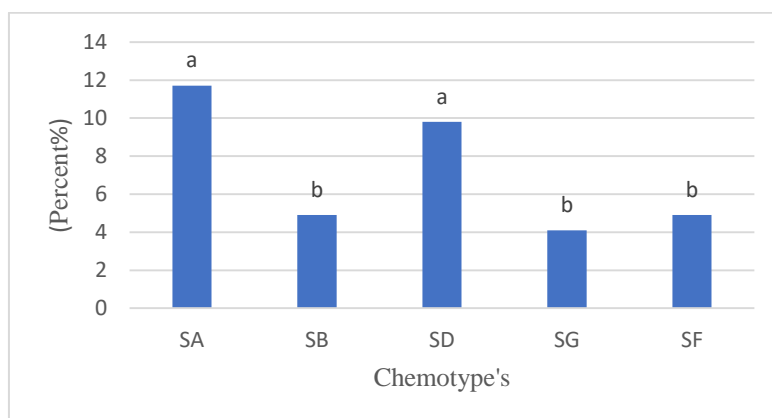
\*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، \*\*معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

\*Significant at probability level 5%, \*\* Significant at probability level in 1%.

وجود دارد، بطوریکه بیشترین مقدار این متابولیت در تیپ بیوشیمیایی وحشی بیشتر از سایر نمونه‌ها بود (شکل ۵). احتمالاً بدلیل اینکه کلاله وحشی این تیپ بیوشیمیایی در زمان سرد سال (اوایل بهار) از ارتفاعات جمع‌آوری شده بوده و گیاه به مرحله گرده افشانی کامل نرسیده و همانطور که در بخش نمونه‌های گیاهی شرح داده شده این کلاله به رنگ نارنجی بوده که نارنجی بودن رنگ کلاله اثبات کننده این ادعا می‌باشد، و گیاه به دلیل سردی هوا و عدم تامین نیاز ظرفیت گرمایی مراحل زایشی را بطور کامل سپری نماید.

### شناسایی آپوکروتوئیدها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

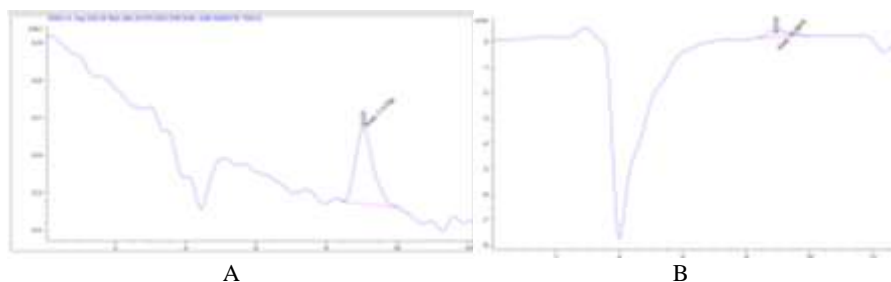
متابولیت غیر قطبی شناسایی شده در این تحقیق پیکروکروسین بود، پیک مربوط به این ماده در موقعیت زمان بازدارندگی دقیقه ۹ از کروماتوگرام حاصل شده با دستگاه HPLC UV/Vis با تطبیق نسبی از نمونه استاندارد ایجاد و شناسایی شد (شکل ۶). مقایسات میانگین با آزمون فیشر حفاظت شده در سطح احتمال ( $p < 0/05$ ) نشان داد که بین نمونه‌های مختلف از نظر داشتن متابولیت پیکروکروسین اختلاف معنی‌داری



شکل ۵- مقایسات میانگین با آزمون فیشر حفاظت شده در سطح احتمال ( $p < 0/05$ ) جهت ارزیابی آماری متابولیت پیکروکروسین

Figure 5- Mean comparisons with protected Fisher test at probability level ( $p < 0.05$ ) for statistical evaluation of Picrocrocin metabolite.





شکل ۶- کروماتوگرام حاصل شده از متابولیت پیکروکروسین مربوط به تزریق استاندارد (A) و عصاره تیپ بیوشیمیایی وحشی (SA) (B) به دستگاه HPLC UV/Vis

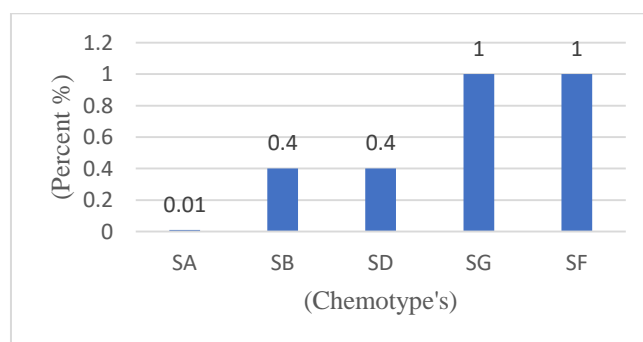
Figure 6- Chromatogram obtained from Picrocrocine metabolite related to standard injection (left) and wild chemotype extract (SA) (right) into HPLC UV / Vis.

مقدار و متابولیت سافراناال در این کیموتیپ در کمترین مقدار یافت شد، می‌توان چنین استنباط نمود که بین این دو متابولیت روند معکوسی وجود دارد. نتایج حاصل شده در این بخش با نتایج حاصل از تحقیق Jarukas و همکاران مطابقت داشت (Jarukas et al., 2022).

#### کروسین

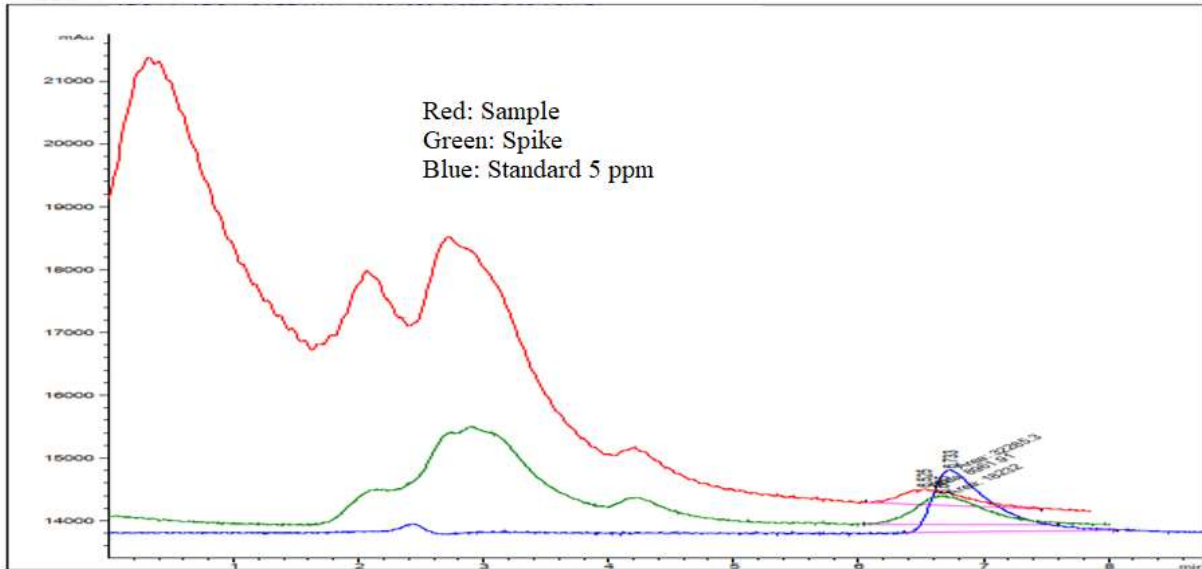
متابولیت کروسین از جمله دیگر متابولیت قطبی شناسایی در عصاره نمونه‌های مورد مطالعه بود. مقایسات میانگین با آزمون فیشر حفاظت شده در سطح احتمال ( $p < 0.01$ )، نشان داد که مقادیر این متابولیت در میان نمونه‌های مورد مطالعه دارای تفاوت معنی‌داری هستند (شکل ۱۰).

سافراناال و کروسین متابولیت‌های قطبی شناسایی شده در این تحقیق بودند، که به ترتیب در زمان بازدارندگی در محدوده دقیقه ۶/۵ و دقیقه ۸/۶ از کروماتوگرام حاصل شده با دستگاه HPLC UV/Vis با تطبیق نسبی از نمونه استاندارد ایجاد و شناسایی شدند (شکل ۸ و ۹). مقایسات میانگین با آزمون فیشر حفاظت شده در سطح احتمال ( $p < 0/05$ ) نشان داد که بین نمونه‌های مختلف از نظر داشتن متابولیت این دو متابولیت اختلاف معنی‌داری وجود دارد، مقدار متابولیت سافراناال در تیپ بیوشیمیایی‌های مشگین شهر (روستای اونار) و هشتجین بیشتر از سایر نمونه‌ها بود و کمترین مقدار این متابولیت در تیپ بیوشیمیایی وحشی (SA) بود (شکل ۷). با توجه به اینکه مقدار متابولیت پیکروکروسین در کیموتیپ وحشی دارای بالاترین

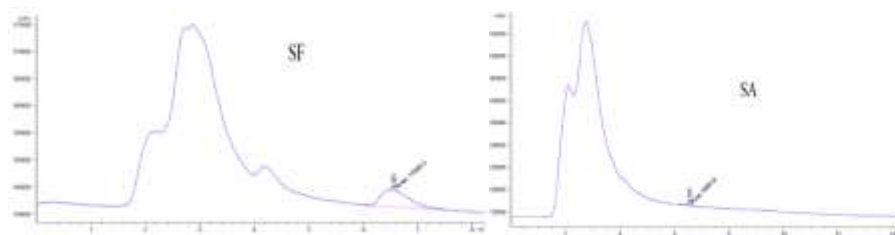


شکل ۷- مقایسات میانگین با آزمون فیشر حفاظت شده در سطح احتمال ( $p < 0/05$ ) جهت ارزیابی آماری متابولیت سافراناال

Figure 7- Mean comparisons with protected Fisher test at probability level ( $p < 0.05$ ) for statistical evaluation of Safranal metabolites.

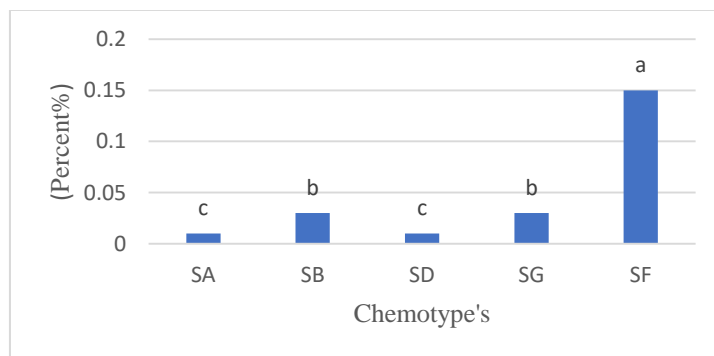


شکل ۸- کروماتوگرام حاصل شده از تزریق استاندارد سافرانال به دستگاه HPLC.  
Figure 8- Chromatogram obtained from Safranin standard injection into HPLC.

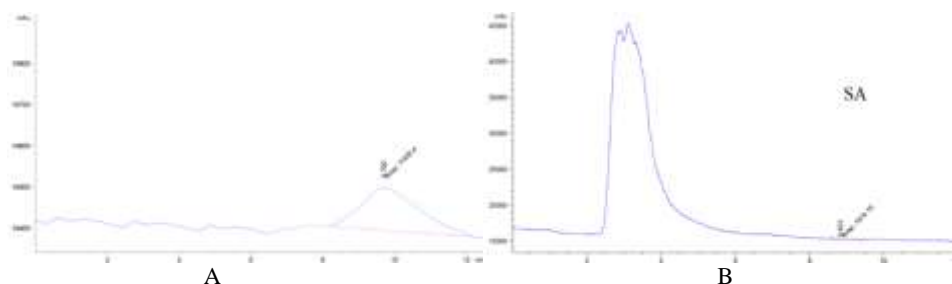


شکل ۹- کروماتوگرام‌های حاصل شده از متابولیت سافرانال مربوط به عصاره تیپ بیوشیمیایی وحشی (SA) و روستای اونار (SF) در تزریق به دستگاه HPLC UV/Vis

Figure 9- Chromatograms obtained from Safranin metabolites related to extracts of wild chemotype (SA) and Onar village (SF) injected into HPLC UV / Vis.



شکل ۱۰- مقایسات میانگین حاصل از مقادیر متابولیت کروسین در نمونه‌های مختلف در آنالیز با HPLC.  
Figure 10- Comparisons of mean values of Crocin metabolites in different samples in HPLC analysis.



شکل ۱۱- کروماتوگرام حاصل شده از تزریق استاندارد کروسین (B) و عصاره نمونه وحشی (A) به دستگاه HPLC.  
Figure 11- Chromatogram obtained by standard injection of Crocin (B) and wild sample extract (A) into HPLC.

به همین خاطر در این پروژه داده‌های حاصل از روش کروماتوگرافی به عنوان معیار استناد ندارد و دقیق سنجش متابولیت‌ها در آنالیزهای آماری مورد استفاده قرار گرفتند. در شکل ۵ در تیپ بیوشیمیایی SA مقادیر بالایی از متابولیت پیکروکروسین نسبت به دیگر تیپ‌های بیوشیمیایی مشاهده شد، از جمله احتمالاً در این زمینه علاوه بر عدم تکمیل دوره گرده افشانی در این گیاه، می‌توان گفت متابولیت پیکروکروسین که به عنوان پیش ماده برای سنتز سافرانال است به دلیل عدم کارکرد مناسب آنزیم‌های دخیل در جهت تبدیل به ماده هدف، در سیتوزل سلولی تجمع یافته و در زمان استخراج مقادیر بیشتری را در محتویات عصاره استخراج شده به خود اختصاص داده و همین امر منجر به ایجاد پیک قدرتمندی نسبت به دیگر تیپ‌های بیوشیمیایی شده باشد، با مراجعه به شکل ۵ این استنباط به راحتی قابل پذیرش خواهد بود چرا که در این شکل که مربوط به مقادیر ماده سافرانال (از پیش ماده پیکروکروسین) است مقادیر این ماده در مقایسه با دیگر کیموتایپ‌ها در حداقل بوده و همبستگی منفی بین متابولیت پیکروکروسین و سافرانال را تیپ بیوشیمیایی SA شاهد هستیم. تاکنون منابعی از تحقیقات منجم در ارتباط با سنجش متابولیتی تیپ بیوشیمیایی زعفران وحشی رویش یافته در مناطق مختلف انجام نشده است. میزان سافرانال در بین تیپ‌های بیوشیمیایی در SF و SG در بالاترین مقدار بود، همبستگی منفی بین مقادیر سافرانال و پیکروکروسین در نمونه های SF در مراجعه به شکل های ۵ و ۶ کاملاً مشهود

از بین نمونه‌ها تیپ بیوشیمیایی مشگین شهر (روستای اونار) دارای برتری نسبتاً بالایی از نظر داشتن متابولیت کروسین بود. در تحقیقی (Hosseinpour Azad et al., 2016)، با بکارگیری روش استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنج جرمی (LC/MS) در زمان بازداری با حدود تقریبی دقیقه ۱۰ متابولیت کروسین را در محتویات عصاره زعفران تزریق شده به دستگاه شناسایی نمودند، که با نتایج حاصل از این پروژه مطابقت داشتند (شکل ۱۱).

#### تحلیل داده‌های اسپکتروسکوپی و کروماتوگرافی مایع

در بررسی نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی در طول موج ۲۵۷ نانومتر برای متابولیت پیکروکروسین (شکل ۲) و شکل ۵ حاصل از این آپو کاروتنوئید به روش HPLC مقادیر متفاوتی از این متابولیت را مشاهده می‌نماییم، احتمالاً دلیل این مساله عدم کارایی روش اسپکتروسکوپی در تشخیص متابولیت پیکروکروسین در محتویات متابولیتی عصاره زعفران بوده باشد، زیرا در این روش متابولیت‌ها بطور ترکیبی در محتویات عصاره در دامنه‌ای از طول موج جذبی و بر اساس میزان جذب طول موج تابیده شده سنجش یافته اما در روش HPLC UV/Vis ابتدا تمامی متابولیت‌ها بر اساس نوع ستون کروماتوگرافی از همدیگر تفکیک یافته و نهایتاً در زمان خروج از ستون تحت امواج تابشی طیف سنجی قرار می‌گیرند و این روند تفکیک و شناسایی منجر به بالا رفتن دقت سنجش در این روش می‌گردد،

تحقیقی اثر دماهای مختلف بر روی تجمع انواع کاروتنوئیدها در سیانوکر آنابنا به اثبات رسیده است در این تحقیق از بین تیمارهای اعمال شده که کمترین تیمار مربوط به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بود تجمع متابولیت بتاکاروتن در محتویات عصاره سلولی ثابت گردید (Ktodawska et al., 2019). احتمالاً در موقعیت بالاتر از سطح دریا به همراه پایین بودن دما که تیپ بیوشیمیایی SF نسبت به سایر تیپ بیوشیمیایی‌ها در چنین شرایطی قرار داشت، با افزایش مقدار متابولیت بتاکاروتن که پیش ماده برای مسیر بیوستتزی متابولیت کروسین از مسیر شکست آنزیمی زاگرانین است، بطور غیر مستقیم با قرارگیری فراوان به‌عنوان پیش ماده در دسترس آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوستتزی منجر به افزایش متابولیت کروسین شده باشد. همچنین احتمالاً پائینی درجه حرارت با تغییر رفتار آنزیم‌های مسیر منجر به تشدید در سنتز این ماده بوده باشد. از دیگر عوامل مجدداً می‌توان به روش استخراج عصاره سلولی نیز اشاره کرد. در مطالعه‌ای استخراج کروسین از زعفران به‌عنوان یک منبع دارویی طبیعی با روش تبلور مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که در تمام داده‌های بدست آمده مقدار کروسین موجود در نمونه‌ها به‌طور قابل توجهی بیشتر از کروسین شرکت سیگما بوده، که می‌تواند به‌عنوان یک استاندارد قابل اطمینان استفاده شود. در این مطالعه، با استفاده از یک روش ساده و ارزان کروسین با خلوص بالا تولید شد (Sedaghati & Abbaszadeh, 2018). آپوکاروتنوئیدها به دلیل ساختار پیچیده و مراکز کایرال فراوان، نمی‌توانند به‌صورت شیمیایی سنتز شوند و به همین دلیل علاقه صنعتی زیادی به تولید بیوتکنولوژی آنها وجود دارد (Bisti et al., 2014; Demurtas et al., 2018). در تحقیقی به بررسی نمونه‌های زعفران رویش یافته در شرقی کشور با استفاده از دستگاه HPLC UV/Vis پرداخته و مقادیر این متابولیت‌ها را به ترتیب به میزان ۱۰/۹، ۱۲/۶۲ و ۶/۳۵ میلی‌گرم در هر گرم از ماده خشک گزارش نمودند

بوده، اما برای نمونه SG که از نظر مقدار سافرانال در رتبه بود روند معکوسی مشاهده نگردید. احتمالاً شرایط حاکم بر استخراج و سنجش مستقل از هم عصاره متابولیت‌ها از عوامل تأثیرگذار در عدم تطابق این روند باشد. در تحقیقات متعددی اثر عوامل مختلف دخیل در استخراج آپوکاروتنوئیدها در زعفران مطالعه شده است. در تحقیقی ترکیبات فعال زعفران با بهره‌گیری از فراصوت با توان بالا در بسامد ثابت ۳۰ کیلوهرتز استخراج و تأثیر عوامل مختلف شامل شدت صوت، زمان و روش سونیکاسیون در دمای ۲۰°C بر بازده استخراج، بررسی شده است. اثبات شده است که بهره‌گیری از روش فراصوت پالسی با دوره‌های زمانی کوتاه نسبت به حالت پیوسته کارایی بیشتری دارد (Kyriakoudi & Tsimidou, 2018). همچنین اثر دمای استخراج و همچنین فشار هوایی حاکم بر محفظه استخراج می‌تواند از عوامل دخیل در حلالیت متابولیت و انتقال به فاز آبی یا قطبی باشد که این شرایط منجر به تسریع در عملکرد آنزیمی در تبدیل ماده پیکروکروسین به سافرانال باشد. در بررسی تطبیقی نتایج اسپکتروسکوپی و کروماتوگرافی مایع (HPLC UV/Vis) برای متابولیت کروسین به‌مانند دیگر متابولیت‌های مطالعه شده ارتباط دقیق با روند مشخص بین این دو روش ارزیابی مشاهده نگردید. احتمالاً عدم وجود تفاوت معنی‌دار در مقادیر این متابولیت در بین تیپ‌های بیوشیمیایی در روش اسپکتروسکوپی وجود بسیار اندک متابولیت کروسین بوده باشد (شکل ۴). اما نتایج کروماتوگرافی مایع دارای تفاوت معنی‌داری در مقادیر این متابولیت در بین کیموتایپ‌های مورد مطالعه بود (شکل ۷). وجود تفاوت معنی‌دار در مقادیر متابولیت کروسین بین تیپ بیوشیمیایی SF و دیگر تیپ‌های بیوشیمیایی، احتمالاً بالا بودن ارتفاع از سطح دریا و خنکی هوا در این منطقه نسبت به مناطق دیگر بوده باشد. طی تحقیقات متعددی تجمع کاروتنوئیدها در اندامک‌های سلولی از واکوئل و همچنین در سیتوپلاسم در شرایط دمایی پایین به اثبات رسیده است، در

مستقیم با کیفیت زعفران تولیدی خواهند داشت. با توجه به اینکه در بین مناطق مورد مطالعه کیموتایپ مشگین‌شهر (روستای اونار) دارای مقادیر بالاتری از متابولیت کروسین و سافراناال نسبت دیگر نقاط مورد مطالعه بود می‌توان ادعا نمود که با تبعیت از الگوی کمی آپوکاروتنوئیدهای کروسین و سافراناال این منطقه از استان اردبیل دارای غالبیت کمی و کیفی جهت توسعه کشت این محصول نسبت به دیگر مناطق این استان می‌باشد، هر چند که تبعیت از تحقیقات تکمیلی در این زمینه انکارناپذیر خواهد بود.

(Hoshyar & Mollaei, 2017). که با یافته‌های حاصل این پروژه دارای تطابق نسبی بودند.

## نتیجه‌گیری

انتقال کورم‌های این گیاه از شهرستان‌های شمال شرقی به استان اردبیل این گیاه را در معرض تغییرات شدید شرایط رشدی قرار داده و به احتمال بالایی گیاه جهت مقابله با این تغییرات و سازگاری به محیط جدید، طیف وسیعی از مسیرهای بیوسنتزی خود را دستخوش تغییرات گسترده‌ای می‌نماید. این تغییرات ممکن است همراه با جنبه‌های منفی و مثبت بوده که همبستگی

## منابع

- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Nebauer, S.G., Molina, R.V., and Gómez-Gómez, L. 2015. Saffron: its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 63 (40): 8751-8764. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03194>
- Azarabadi, N., and Özdemir, F. 2018. Determination of crocin content and volatile components in different qualities of Iranian saffron. *Turkish Journal of Gıda* 43 (3): 476-89. <https://doi.org/10.15237/gida.GD18018>
- Bergomi, A., Comite, V., Santagostini, L., Guglielmi, V., and Fermo, P. 2022. Determination of Saffron Quality through a Multi-Analytical Approach. *Foods* 11: 3227. <https://doi.org/10.1021/jf5019356>
- Bisti, S., Maccarone, R., and Falsini, B. 2014. Saffron and retina: Neuroprotection and pharmacokinetics. *Visual Neuroscience* 31 (4-5): 1-7. <https://doi.org/10.1017/S0952523814000108>
- Demurtas, O.C., Frusciante, S., Ferrante, P., Diretto, G., Hosseinpour Azad, N.H., Pietrella, M., Aprea, G., Taddei, A.R., Romano, E., Mi, J., and Al-Babili, S. 2018. Candidate enzymes for saffron crocin biosynthesis are localized in multiple cellular compartments. *Plant Physiology* 177 (3): 990-1006. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01815>
- Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., and Giuliano, G. 2013. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant Physiology* 163: 986-989. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224733>
- Gomez-Gomez, L., Rubio-Moraga, A., and Ahrazem, A. 2010. Understanding carotenoid metabolism in saffron stigmas: unraveling aroma and colour formation. *Global Science Books.UK/ Japan*, 56-63. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elx003>
- Hoshyar, R., and Mollaei, H.A. 2017. Comprehensive review on anticancer mechanisms of the main carotenoid of saffron, crocin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69 (11): 1419-1427. <https://doi.org/10.1111/jphp.12776>
- Hosseinpour Azad, N., Nematzadeh, G.A., Giuliano, G., Ranjbar, G.A., and Yamchi, A. 2016. Identification of apo-carotenoids' crocin

- and crocetin isomers in saffron crude extracts by HPLC coupled to atmospheric pressure chemical ionization and high-resolution orbitrap mass spectrometry. *Saffron Agronomy and Technology* 21 4 (4): 291-300. (In Persian whit English Summary).  
<https://doi.org/10.22048/jsat.2016.38670>
- Jarukas, L., Vitkevicius, K., Mykhailenko, O., Bezruk, I., Georgiyants, V., and Ivanauskas, L. 2022. Effective isolation of picrocrocin and crocins from saffron: from HPTLC to working standard obtaining. *Molecules* 27: 4286. <https://doi.org/10.3390/molecules27134286>
- Kiani, S., Minaei, S., and Ghasemi-Varnamkhasti, M. 2017. Instrumental approaches and innovative systems for saffron quality assessment. *Journal of Food Engineering* 216: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.022>
- Ktodawska, K., Bujas, A., Tuross-Cabal, M., Zbik, P., Fu, P., and Malec, P. 2019. Effect of growth temperature on biosynthesis and accumulation of carotenoids in cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 under diazotrophic conditions. *Microbiological Reserch* 226: 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.05.003>
- Kyriakoudi, A.Z., and Tsimidou, M. 2018. Latest advances in the extraction and determination of Saffron apocarotenoids. *Electrophoresis* 39 (15): 1846-1859. <https://doi.org/10.1002/elps.201700455>
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S., and Rajabzadeh, G. 2015. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic, and gelatin as wall materials. *Food Hydrocoll* 51: 327-237.
- Sajjadi, M., and Bathaie, Z. 2017. Comparative study on the preventive effect of saffron carotenoids, crocin, and crocetin, in NMU-induced breast cancer in rats. *Cell Journal (Yakhteh)*. 19 (1): 94. (In Persian whit English Summary). <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.3901>
- Sedaghati, S., and Abbaszadeh, F. 2018. Extraction of saffron crocin as a natural pharmaceutical source with crystallization method. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences* 7 (4): 84-87. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2010.691.698>
- Shahi, T., Assadpour, E., and Jafari, S.M. 2016. Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of red gold Saffron. *Trends Food Science Technology* 58: 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.010>