تشخیص خامه‌های رنگ شده به عنوان یکی از تقلب‌های زعفران توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

بهزاد حقیقی[1]، جوادفیضی[1]، عباس همتی کاخکی[2]

چکیده

یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکار سازی فرابنفش- مرئی برای تشخیص زعفران‌های تقلبی ناشی از افـزودن خامـه‌هـای رنگ شده با رنگهای طبیعی استخراج شـده از گلبـرگ زعفـران، رونـاس، گلرنـگ و چغنـدر قرمـز بـه زعفـران خـالص ارایـه شـده اسـت. کروماتوگرامهای عصاره آبی- متانولی (۵۰٪ حجمی- حجمی) زعفران خالص و زعفران‌های تقلبی با استفاده از سـتون فـاز معکـوس $C_{۱۸}$، گرادیان خطی از ۲۰ تا ۸۰ ٪ متانول در آب به مدت یک ساعت با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای $30\ ^{\circ}C$ ثبت گردید. تسـت آماری آنالیز واریانس دو بعدی برروی داده‌های حاصل از آنالیز کروماتوگرام های زعفران خالص و زعفران‌هـای تقلبـی بـه ترتیـب در طـول موج‌های ۵۲۰ (یا ۲۵۴)، ۴۰۲ (یا ۲۵۴)، ۲۶۰ و ۵۳۵ (یا ۴۴۰) نانومتر اعمال و حضور خامه‌های رنگ شده با محلول‌های رنگی استخراج شده از گلبرگ زعفران (وزنی ۹/۱٪ >)، خامه‌های رنگ شده با محلول‌های رنگی استخراج شده از گلرنگ (وزنی ۱۴/۶٪ >)، خامـه‌هـای رنـگ شده با محلول‌های رنگی استخراج شده از روناس (وزنی ۹/۱٪ >) و خامه‌های رنگ شده با محلول‌های رنگی استخراج شده از چغندر قرمـز (وزنی ۱۴/۳٪ >) به وضوح شناسایی شدند.

کلمات کلیدی: زعفران، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تقلب، خامه‌های رنگ شده

مقدمه

زعفران، کلاله‌های خشک و قرمز رنگ گیاه کروکـوس ساتیوس از خانواده زنبـق اسـت(۱و ۱۷). امـروزه بجـز ایـران مهمترین کشورهای تولید کننده زعفران، اسپانیا، یونان، هنـد و مراکش می‌باشند. سالیانه حدود ۲۵۰ تن زعفران در جهـان تولید می‌شود که ۲۰۰ تن آن مربوط به ایران اسـت (۲و ۱۰). در طـی دهـه گذشـته مطالعـات زیـادی در زمینـه ترکیبـات شیمیایی زعفران توسط گروههای تحقیقـاتی مختلـف انجـام گرفته است (۶و ۸-۹و ۱۶و ۱۸-۱۹و ۲۰و ۲۲و ۲۶). کیفیـت زعفران توسط سه متابولیت ثانویـه: کروسـین و مشـتقات آن

۱- عضو هیات علمی مرکز تحصیلات تکمیلی در علوم پایه دانشگاه زنجان، : haghighi@iasbs.ac.ir
۲-کارشناس ارشد شیمی تجزیه ،مرکز تحصیلات تکمیلی در علوم پایه زنجان.
۳-کارشناس ارشد صـنایع غـذایی، عضـو هیـات علمـی پـارک علـم وفنـاوری خراسان، مشهد.

مسئول رنگ ، پیکروکروسین عامل طعم و سافرانال عامل عطر و بوی زعفران تعیین می‌شود (۷). علاوه بر این زعفران شامل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، فلاونوئیدها، آمینواسیدها، مواد معدنی، صمغ و ترکیبات شیمیایی دیگر نیز می باشد (۱و ۱۵و ۲۴). زعفران گرانبهاترین گیاه زراعی موجود در روی کره زمین است که از گذشته‌های دور به دلیل رنگ زیبا و عطر و طعم استثنایی آن در مواد غذایی مختلف کاربرد داشته است (۱۷). در سالهای اخیر با توجه به شناسایی دقیق ترکیبات زعفران، تحقیقات زیادی در خصوص اثرات درمانی آنها صورت گرفته و توجه به اثرات بیولوژیکی و کاربردهای دارویی آن افزایش یافته است. در مورد اثرات ضدسرطانی زعفران نیز گزارشهای متعددی در سالهای اخیر منتشر شده است (۲و ۴-۵و ۱۵).

از آنجایی که زعفران محصولی گرانقیمت است، به شیوه‌های گوناگون توسط افراد سودجو مورد تقلب قرار می‌گیرد. متاسفانه بسیاری از واسطه‌ها یا فروشندگان که به فکر استفاده از بازار پرفروش و پررونق زعفران با توجه به قیمت بالای آن افتاده‌اند، گاهی ممکن است برای کم کردن هزینه‌های تولید با استفاده از مواد آلی و معدنی مختلف دست به تقلب بزنند و زعفران‌های رنگ شده تقلبی ویا به صورت مخلوط با زعفران خالص را اغلب با کیفیت و کمیت نامناسبی بسته‌بندی و به بازار عرضه نمایند و از این راه سلامت مردم را به خطر بیندازند. زعفران معمولاً توسط افزودن مواد با منشا گیاهی از جمله خامه‌هایی که توسط چوب برزیلی، چوب صندل و یا رنگهای مصنوعی (مثل تارترازین) رنگ شده‌اند، مورد تقلب قرار می‌گیرد. گاهی اوقات با انبار نمودن زعفران در محل‌های مرطوب و یا اسپری کردن ذرات ریز آب به داخل زعفران، باعث افزایش وزن آن می‌شوند (۱۷و ۲۵). چندین روش اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی جهت اندازه‌گیری کیفی و بررسی پایداری زعفران گزارش شده است (۱۴و ۲۳)، اما این روشها برای اندازه‌گیری کمی ترکیبات زعفران مناسب نیستند. روشهای کروماتوگرافی بسیاری برای تعیین ترکیبات زعفران وجود دارد (۳و ۲۲) ، اما روشی که توسط لوزانو[1] و همکاران (۸) ارائه شد، تنها گزارش تحقیقاتی است که رابطه بین ترکیبات تشکیل دهنده زعفران و کیفیت گونه تجاری آن را بیان می‌کند. در آن روش اندازه‌گیری کمی متابولیت‌های ثانویه و بعضی تقلبات شیمیایی موجود در زعفران به صورت همزمان انجام شده بود.

هدف اصلی این تحقیق اعمال تست آماری آنالیز واریانس روی داده‌های کروماتوگرافی حاصل از آنالیز زعفران‌های خالص و تقلبی و شناسایی چهار نوع تقلب زعفران است، لذا رنگهای طبیعی گلبرگ زعفران، گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)، روناس (*Rubia Tinctorum*) و ریشه چغندر قرمز (*Beta vulgaris* L.) استخراج و جهت رنگ آمیزی خامه‌های زعفران بکار برده شدند. سپس خامه‌های رنگ شده، با زعفران خالص مخلوط و کروماتوگرام‌های عصاره زعفران خالص و زعفران‌های تقلبی در طول موج و زمان‌های بازداری مشخص مقایسه شدند. سپس داده‌های کروماتوگرامها در پارامترهای انتخاب شده با استفاده از تست آنالیز واریانس دوبعدی برای تمایز بین زعفران خالص و تقلبی آنالیز شدند.

شرایط آزمایشگاهی

مواد شیمیایی

زعفران خالص، گلبرگ و خامه زعفران از مزارع روستای صفی‌آباد تربت حیدریه تهیه و در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور حفظ پایداری نگهداری شدند. گلرنگ، روناس و چغندر قرمز از عطاری‌های شهر زنجان تهیه شدند. ۴- نیتروآنیلین (به عنوان استاندارد درونی)

1 Lozano

و دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجهٔ خلوص تجزیه‌ای از شرکت‌های مرک و فلوکا تهیه شدند.

تجهیزات

در این تحقیق از اسپکتروفتومتر *Pharmacia Biotech 4000* برای ثبت طیف‌های جذبی ماوراءبنفش- مرئی استفاده گردید. همچنین از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از شرکت *Knauer* مجهز به پمپ دو پیستونی *Wellchrom K-1001* و دتکتور ماوراءبنفش- مرئی مدل *Wellchrom K-2600* و ستون کروماتوگرافی *C_{18} Nucleosil-100* به طول ۱۲/۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴ میلی‌متر با مواد پر شدهٔ ۵ میکرومتری استفاده شد.

اندازه‌گیری‌های *pH* توسط *pH* متر *Metrohm* مدل ۷۱۳، و دستگاه سانتریفوژ مدل *Biofuge primo R* به منظور ترسیب مواد معلق نمونه‌های استخراج شده استفاده گردید.

استخراج محلول‌های رنگی گلبرگ زعفران، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز

۵ گرم از گلبرگ خشک شده زعفران در هاون چینی ساییده، با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال (شامل ۸۵ میلی‌لیتر متانول و ۱۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱/۵ مولار) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد. ۱۰ گرم روناس خشک در هاون چینی ساییده، با ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر خلوص کروماتوگرافی و ۲۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت رفلاکس شد. ۵ گرم گلرنگ در هاون چینی ساییده، با ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر خلوص کروماتوگرافی که توسط محلول سود ۰/۵ مولار *pH* آن به ۹/۵ رسیده بود و ۲۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رفلاکس شد. برای استخراج محلول رنگی از چغندر قرمز از روش پرس کردن استفاده شد. در این روش ۲۰ گرم از خلال‌های چغندر داخل سرنگ ریخته و با اعمال فشار به پیستون سرنگ، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول رنگی چغندر قرمز استخراج شد. محلول‌های رنگی بدست آمده به کمک بوخنر خلأ با کاغذ واتمن شماره ۰/۷ صاف گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت محلولهای مادر استخراج شده از گلبرگ زعفران، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱ و ۲ گرم بر میلی‌لیتر است. محلول‌های کار توسط رقیق کردن محلول‌های مادر توسط متانول- آب (۵۰٪ حجمی/حجمی) تهیه شدند.

تهیه خامه‌های رنگ شده و زعفران‌های تقلبی

یک میلی‌لیتر از محلول‌های رنگی استخراج شده که نسبت به گلبرگ زعفران، گلرنگ ، روناس و چغندر قرمز به ترتیب دارای غلظتهای ۰/۰۱۷، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱ و۲ گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد، به‌وسیله افشانه به یک گرم خامه که روی شیشه ساعت پهن شده است، ۵ الی ۶ بار اسپری و سریعاً توسط سشوار خشک شد. زعفران‌های تقلبی با اضافه کردن خامه‌های رنگ شده به کلاله‌های زعفران خالص با نسبت‌های وزنی (۱ به ۳)، (۰/۵ به ۳)، (۰/۳ به ۳)، (۰/۲ به ۳)، (خامه‌های رنگ شده به زعفران خالص)، ساخته شدند. زعفران‌های تقلبی ساخته شده به ترتیب نسبت وزنی، دارای ۲۵، ۱۴/۳، ۹/۱ و ۶/۳ درصد ناخالصی از نوع خامه رنگ شده بودند. زعفران‌های تقلبی ساخته شده از نظر ظاهری کاملا" مشابه با زعفران خالص بوده به طوری که توسط چشم قابل تشخیص نبودند.

استخراج محلول رنگی زعفران خالص و زعفران‌های تقلبی

۴۰۰ میلی‌گرم از کلاله‌های قرمز زعفران در هاون چینی ساییده، با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی‌لیتر متانول خلوص کروماتوگرافی مخلوط و به مدت یک‌ساعت در

تاریکی توسط همزن مغناطیسی در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد. برای جدا کردن باقیمانده‌های گیاهی مخلوط حاصل، از بوخنر خلأ با کاغذ واتمن شماره ۰/۷ استفاده شد (۸و ۲۲-۲۳). محلول‌های حاصل با سرعت *rpm* ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در همه آنالیزها غلظت زعفران ۲/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. قبل از آنالیز کروماتوگرافی، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۴- نیتروآنیلین (۰/۱۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۲ میلی‌لیتر محلول زعفران (۲/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مخلوط و با استفاده از غشاهای سلولزی(*Minisart 0.45 µm*) صاف می گردید. محلول‌های مادر و کار زعفران به ترتیب بصورت هفتگی و روزانه تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

روش کروماتوگرافی

مطابق روش ارائه شده توسط لوزانو و همکاران، از سیستم گرادیان حلال آب (*A*) و متانول(*B*) به عنوان فاز متحرک استفاده شد. فاز متحرک با برنامه اولیه *A*-*B*,(۸۰:۲۰حجمی/حجمی) شروع و با برنامه افزایش متانول به صورت تغییرات خطی یک در صد در دقیقه به مدت یک ساعت به برنامه نهایی *A*-*B*, (۲۰:۸۰حجمی/حجمی) می رسید. در طول مدت آزمایش سرعت جریان به میزان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ستون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه‌داشته می شد. مقدار نمونه تزریقی به دستگاه ۵۰ میکرولیتر بود و همه آنالیزها ۴ مرتبه تکرار می شد.

بحث و نتیجه گیری

طیف نگاری فرابنفش- مرئی

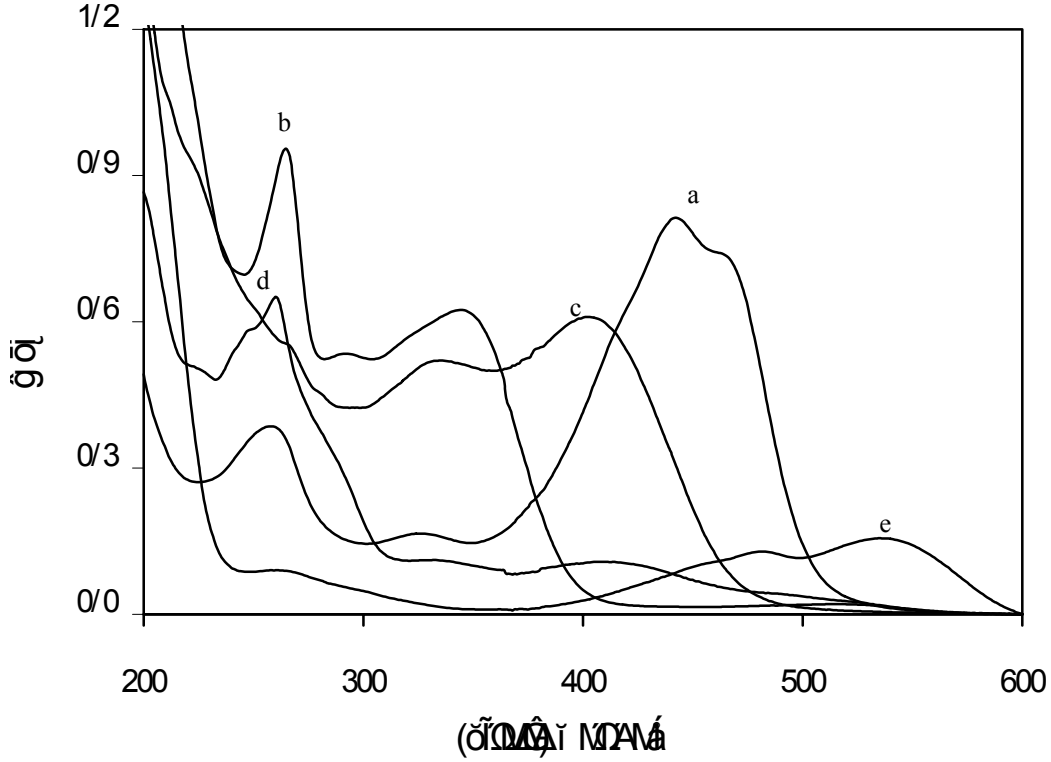
طیف جذبی عصاره آبی- متانولی زعفران خالص و خامه‌های رنگ شده با رنگهای استخراج شده از گلبرگ زعفران، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس استاندارد تدوین شده از سوی مؤسسهٔ بین‌المللی استاندارد *ISO* جذب ماکزیمم در ۴۴۰ نانومتر مربوط به کروسین‌ها (ترکیبات رنگی)، در ۳۳۰ نانومتر مربوط به سافرانال (عامل عطر و بو) و در ۲۵۴ نانومتر مربوط به پیکروکروسین (عامل طعم) می‌باشد (۱۳و ۲۱-۲۲).

همانطور که شکل ۱ نشان می‌دهد، طیف جذبی عصاره خامه رنگ شده با گلبرگ زعفران دارای چهار طول موج ماکزیمم ۲۶۵، ۲۹۲، ۳۴۵ و ۵۲۰ نانومتر می‌باشد که با مقایسه آن با طیف جذبی زعفران خالص، در طول موج‌های ۴۴۰ و ۵۲۰ نانومتر تفاوت بین دو طیف جذبی مشاهده می‌شود. طیف جذبی عصاره خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از گلرنگ دارای دو باند جذبی در ۳۳۵ و ۴۰۲ نانومتر، عصاره خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از روناس دارای سه باند جذبی در ۲۶۰، ۳۳۰ و ۴۱۰ نانومتر و عصاره خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از چغندر قرمز دارای سه باند جذبی در ۲۶۲، ۴۸۳ و ۵۳۵ نانومتر می‌باشد، لذا با توجه به تفاوت طول موجهای مشاهده شده، طول موجهای ۵۲۰، ۴۰۲ و ۲۶۰ و ۵۳۵ نانومتر بعلاوه طول موجهای ۲۵۴، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر (طول موجهای ماکزیمم جذب در زعفران خالص) به ترتیب برای آنالیز عصاره رنگی استخراج شده از خامه رنگ شده با محلول رنگی استخراج شده از گلبرگ زعفران، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز انتخاب شدند.

آنالیز کروماتوگرافی

کروماتوگرامهای عصاره آبی- متانولی زعفران خالص و زعفرانهای تقلبی(۵۰٪ حجمی/ حجمی) ناشی از افزودن خامه‌های رنگ شده با محلولهای رنگی استخراج شده از گلبرگ زعفران، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز با نسبتهای وزنی ۶/۳، ۹/۱، ۱۴/۳ و ۲۵٪ (وزنی/وزنی) به ترتیب در سه طول موج عمومی ۲۵۴، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر(مربوط به زعفران خالص) و طول موجهای ۵۲۰، ۴۰۲، ۲۶۰ و ۵۳۵

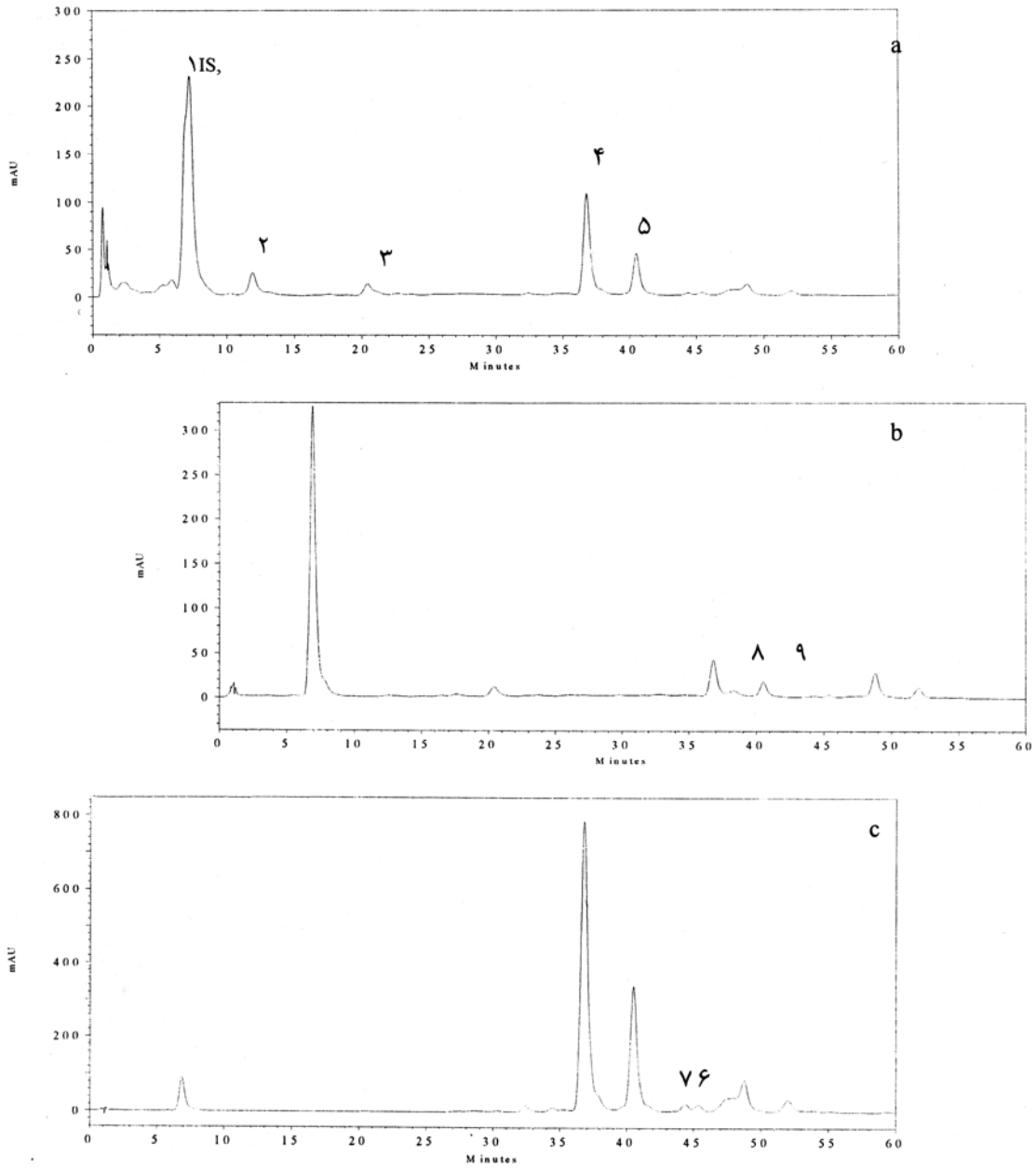
نانومتر (به ترتیب مربوط به گلبرگ زعفران، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز) ثبت شد. شکل ۲ کروماتوگرامهای عصاره زعفران در طول موجهای ۲۵۴، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر را نشان می‌دهد.



شکل ۱: طیف‌های فرابنفش- مرئی حلول آبی- متانولی (۵۰٪ حجمی/ حجمی) زعفران خالص (۰/۰۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر ,a) و خامه‌های رنگ شده با رنگهای استخراج شده از گلبرگ زعفران (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر ,b) ، گلرنگ (۰/۱۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر ,c)، روناس (۰/۱۷ میلی گرم بر میلی‌لیتر ,d) و چغندر قرمز (۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر ,e).

با توجه به تعداد باندهای جذبی و شکل کلی طیف فرابنفش- مرئی زعفران، ۹ متابولیت ثانویه: پیکروکروسین، ۶،۶،۲- تری متیل-۴-هیدروکسی-۱-کربوکسالدهید-۱-سیکلوهگزن (*HTCC*)،۳-جنتیوبیوسیل کامفرول، آلفا کروسین، کروسین۲، کروسین۳، کروسین۴ ، کروسین۵ و کروسین۶ مشخص شدند. هیچ پیکی در طول آنالیز برای سافرانال مشاهده نشد (۸و ۲۱-۲۲). در تمام آنالیزها از ترکیب ۴- نیتروآنیلین به عنوان استاندارد درونی استفاده شد که در زمان بازداری مورد نظر همپوشانی شدیدی بین پیک ۴-نیتروآنیلین و پیکروکروسین مشاهده شد. برای بررسی تغییرات غلظت ترکیبات زعفران در طول آنالیز، غلظت زعفران خالص و استاندارد درونی در همه آزمایشها ثابت (۱/۰۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای زعفران خالص و ۰/۰۹ میلی گرم بر میلی‌لیتر برای استاندارد درونی) و سپس نسبت‌های بین مساحت زیر پیک هر ترکیب و استاندارد درونی ($A_{comp}/A_{I.S.}$) یا مساحت زیر پیک استاندارد درونی بعلاوه پیکروکروسین ($A_{comp}/A_{I.S.}+A_{pic.}$) محاسبه شد. با توجه به نتایج هیچ تغییر کروماتوگرافی، اسپکتروفتومتری و نسبت مساحت زیر پیک‌ها ($A_{comp}/A_{I.S.}$ یا $A_{comp}/A_{I.S.}+A_{pic.}$) مشاهده نشد و این نشان دهنده این است که نمونه‌های

زعفران نگهداری شده در ^{o}C ۴ پایدارند. انحراف استاندارد نسبی برای ۴ بار آنالیز که با استفاده از مساحت زیر پیکشان در طی یک و هفت روز انجام شد به ترتیب بهتر از ۳ و ۱۰ درصد بود.

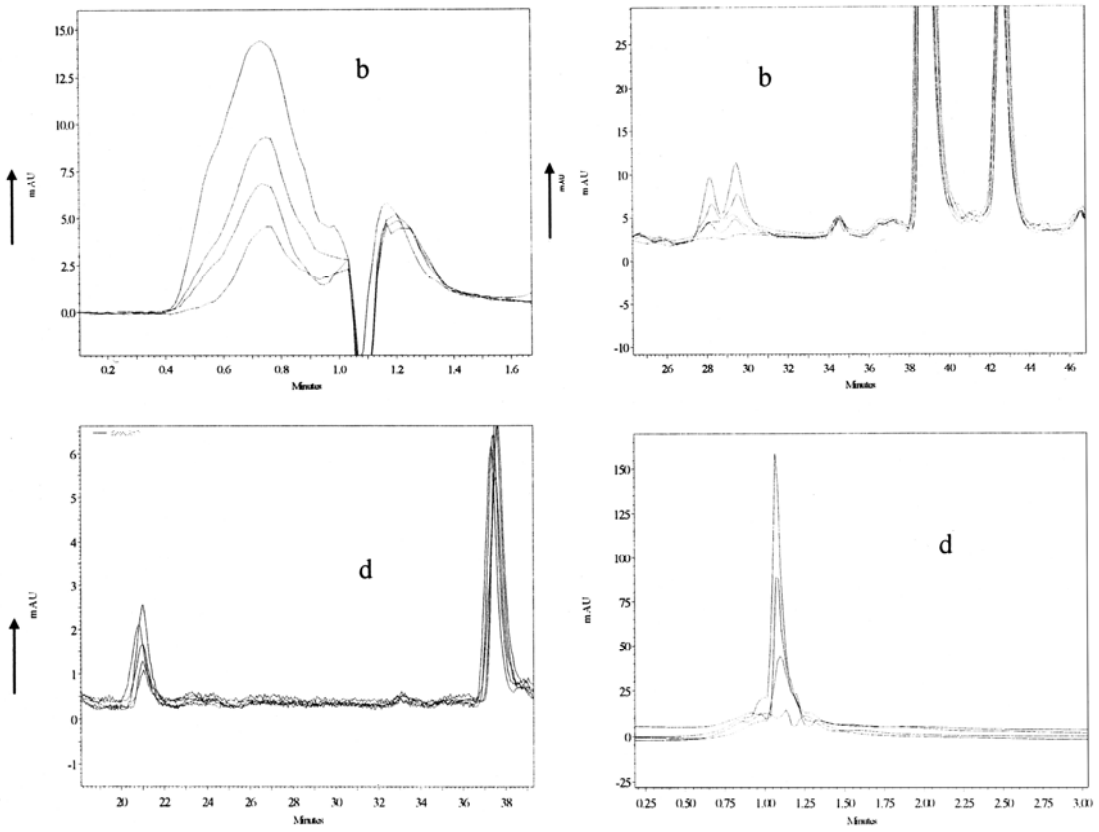


شکل ۲: کروماتوگرام‌های محلول آبی- متانولی (۵۰٪ حجمی-حجمی) زعفران خالص (۱/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در طول موج‌های ۲۵۴ (*a*)، ۳۳۰ (*b*) و ۴۴۰ نانومتر (*c*). استاندارد درونی ۴- نیتروآنیلین (۰/۰۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). فاز متحرک شامل گرادیان خطی از آب و متانول (۲۰ تا ۸۰ ٪ در مدت زمان ۶۰ دقیقه) بود. فاز ثابت $RP\ C_{18}$، سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، دما ^{o}C ۳۰، مقدار نمونه تزریقی ۵۰ میکرلیتر و ترکیبات شامل: پیکروکروسین (۱)، $HTCC$ (۲)، کامفرول (۳)، کروسین آلفا (۴)، کروسین ۲ (۵)، کروسین ۳ (۶)، کروسین ۴ (۷)، کروسین ۵ (۸)، کروسین ۶ (۹) و استاندارد درونی (*I.S.*) می‌باشد.

با مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز محلول استخراج شده از زعفران خالص و کروماتوگرامهای حاصل از آنالیز محلول استخراج شده از خامه رنگ شده با محلول رنگی استخراج شده از گلبرگ زعفران، در زمان بازداری ۲۱/۳ دقیقه پیکی مشاهده می‌شود که مربوط به کامفرول بوده که هم در زعفران خالص و هم در گلبرگ زعفران وجود دارد (۱۱-۱۲). با مقایسه کروماتوگرامهای بدست آمده برای محلول‌های رنگی استخراج شده از خامه‌های رنگ شده با رنگهای طبیعی استخراج شده و مقایسه آنها با کروماتوگرام‌های بدست آمده برای محلول زعفران خالص و زعفران‌های تقلبی در سه طول موج عمومی(۲۵۴، ۳۳۰و ۴۴۰ نانومتر) و طول موجهای انتخابی، چهار زمان بازداری ۲۱/۳، ۱/۱، (۲۷/۸ و ۲۹/۳) و ۰/۸ دقیقه به ترتیب برای تشخیص تقلبات ناشی از افزودن خامه رنگ شده با رنگهای استخراج شده از گلبرگ زعفران، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز انتخاب شدند. سطوح زیر پیکها در زمانهای بازداری انتخاب شده رابطه خطی با غلظت خامه رنگ شده اضافه شده دارد (شکل ۳). تشخیص تقلب ناشی از افزودن خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از گلبرگ زعفران با روش کروماتوگرافی ارائه شده امکان‌پذیر نیست، زیرا پیک ظاهر شده در زمان بازداری ۲۱/۳ دقیقه که مربوط به ترکیب کامفرول می‌باشد، هم در کروماتوگرام زعفران خالص و هم در کروماتوگرام گلبرگ زعفران وجود دارد. تنها در صورتی که کروماتوگرام زعفران خالص برای ما مشخص باشد می‌توان تقلب ناشی از افزودن خامه رنگ شده توسط محلول رنگی استخراج شده از گلبرگ زعفران را تشخیص داد. با تعیین حد آستانه برای مساحت زیر پیک در آنالیز کروماتوگرافی (در حدود ۱۰۰۰)، در زمانهای بازداری ۱/۱ دقیقه (کروماتوگرام مربوط به محلول استخراج شده از خامه رنگ شده با محلول رنگی گلرنگ)، ۲۷/۸ و ۲۹/۳ دقیقه (کروماتوگرام مربوط به محلول استخراج شده از خامه رنگ شده با محلول رنگی روناس) و ۰/۸ دقیقه (کروماتوگرام مربوط به محلول استخراج شده از خامه رنگ شده با محلول رنگی چغندر قرمز) پیکهای مشخصی وجود دارد که در همان زمان‌های بازداری در کروماتوگرام مربوط به زعفران خالص وجود ندارد. بنابراین تشخیص تقلب ناشی از افزودن خامه رنگ شده با رنگهای استخراج شده از گلرنگ، روناس و چغندر قرمز در طول موجها و زمانهای بازداری انتخاب شده براحتی امکان پذیر می‌باشد.

آنالیزداده‌ها

همانطور که ذکر شد در طول موجها و زمانهای بازداری انتخابی برای آنالیز آماری داده ها، در کروماتوگرام زعفران خالص پیک مشخصی وجود نداشت، لذا برای مشاهده مساحت نوفه (نویز) روی خط پایه کروماتوگرام زعفران خالص، حد آستانه به یک سوم مقدار اولیه‌اش کاهش پیدا کرد تا در زمان بازداری مورد نظر پیکی مربوط به نوفه مشاهده شود. سپس مساحت زیر پیک مشاهده شده بعلاوه ۱۰٪ (بعنوان ماکزیمم تغییرات تحت تکرار پذیری مورد مشاهده) بعنوان مساحت نوفه در زمان بازداری و طول موجهای مور نظر انتخاب شد. سپس مساحت نوفه در کروماتوگرام زعفران خالص و مساحت زیر پیک در کروماتوگرام‌های زعفران‌های تقلبی (با ۶/۳، ۹/۱، ۱۴/۳، ۲۵٪ وزنی/ وزنی بعنوان ناخالصی) در طول موجهای (۲۵۴، ۳۳۰ و ۴۴۰، ۵۲۰، ۴۰۲، ۲۶۰و ۵۳۵ نانومتر) و زمانهای بازداری (۲۱/۳، ۱/۱، (۲۷/۸و ۲۹/۳) و ۰/۸ دقیقه) با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس دو بعدی آنالیز شد.



شکل ۳: کروماتوگرام‌های محلول آبی- متانولی (۵۰٪ حجمی- حجمی) زعفران تقلبی ناشی از افزودن مقدارهای متفاوت خامه رنگ شده با رنگهای استخراج شده از گلبرگ زعفران (*a*)، گلرنگ (*b*)، روناس (*c*) و چغندر قرمز (*d*) به زعفران خالص (۱/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). طول موجها ۵۲۰ (*a*)، ۴۰۲ (*b*)، ۲۶۰ (*c*) و ۵۳۵ (*d*) نانومتر، نسبتهای تقلب : صفر، ۶/۳، ۹/۱ و ۱۴/۳٪ وزنی برای *a* و *c* و صفر، ۹/۱ و ۱۴/۳ و ۲۵٪ وزنی برای *b* و *d* در جهت نشان داده شده است. شرایط آزمایش شبیه شکل ۲ می‌باشد.

همان طور که نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد تقلب ناشی از افزودن خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از گلبرگ زعفران (با فرض آگاهی از کروماتوگرام زعفران خالص)، گلرنگ، روناس و چغندر قرمز در طول موجهای انتخابی قابل تشخیص می باشد. وجود بیش از ۹/۱ درصد وزنی خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از گلبرگ زعفران، ۱۴/۳ درصد وزنی خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از گلرنگ، ۹/۱ درصد وزنی خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از روناس و ۱۴/۳ درصد وزنی خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از چغندر قرمز با زعفران خالص، به ترتیب در طول موجهای ۵۲۰، ۴۰۲، ۲۶۰و ۵۳۵ نانومتر قابل تشخیص می‌باشد. علاوه بر طول موجهای انتخابی در طول موج ۲۵۴ نانومتر وجود خامه‌های رنگ شده با رنگ استخراج شده از گلبرگ زعفران (وزنی/وزنی ۹/۱٪ <)، روناس (وزنی/وزنی ۹/۱٪ <) و گلرنگ (وزنی/وزنی ۱۴/۳٪ <) و در ۴۴۰ نانومتر خامه رنگ شده با رنگ (وزنی/وزنی ۱۴۱/۳٪ <) قابل تشخیص است. در ۳۳۰ نانومتر نیز وجود بیش از ۹/۱ ٪ وزنی خامه رنگ شده با رنگ استخراج شده از گلرنگ در زعفران خالص، قابل تشخیص می باشد.

جدول ۱ : نتایج بدست آمده از اعمال تست آنالیز واریانس بر داده‌های کروماتوگرافی بدست آمده از آنالیز زعفران خالص و زعفران‌های تقلبی با نسبتهای مختلف در زمان بازداری و طول موجهای مورد نظر. (w: وزن، RT: زمان بازداری، A_s: مساحت نوفه در زعفران خالص، A_{as}: مساحت زیر پیک زعفران تقلبی، λ: طول موج بر حسب نانومتر $V_1/V_2 = ۱/۳$)

تقلب										
خامه‌های رنگ شده با رنگهای استخراج شده از:	نسبت (w_s:w_{as}) (g:g)	RT (min)	A_{as}/A_s	F	A_{as}/A_s	F	A_{as}/A_s	F	A_{as}/A_s	F
			λ = ۲۵۴		λ = ۳۳۰		λ = ۴۴۰		λ = ۵۲۰	
گلبرگ زعفران	۳ : ۱	۲۱/۳	۳/۲۰	۱۴۶	۲/۲۸	۳۰۷	۱/۳۰	۶	۲/۰۳	۳۶۰
	۳ : ۰/۵		۲/۴۷	۱۳۷	۱/۷۷	۱۴۸	-	-	۱/۳۸	۱۰۷
	۳ : ۰/۳		۲/۰۱	۲۴	۱/۵۴	۷	-	-	۱/۳۳	۱۰۶
	۳ :۰/۲		۱/۴۸	۲	-	-	-	-	۱/۱۲	۹
									λ = ۴۰۲	
گلرنگ	۳ : ۱	۱/۱	۱/۶۶	۸۷	۵/۱۱	۷۱۶	۷/۹۹	۵۹۷	۳/۹۹	۲۵۵
	۳ : ۰/۵		۱/۴۹	۲۷	۴/۲۰	۱۰۲	۵/۸۸	۱۰۴	۲/۹۷	۹۲
	۳ : ۰/۳		۱/۰۹	۷	۳/۴۵	۸۸	۲/۸۵	۸	۱/۳۳	۹
	۳ :۰/۲		-	-	۰/۸۸	۰/۳	-	-	-	-
									λ = ۲۰۶	
رونـاس	۳ : ۱	۲۷/۸	*۱۳/۵۸*	۴۶۷	۲/۴۹	۳	۱/۰۲	۰	۱۰/۲۱	۹۰
			۱۵/۰۱	*۱۹۳۱*	*۲/۰۹*	۳	*۱/۱۸*	۱	*۳۳/۲۲*	*۵۷*
	۳ : ۰/۵		۶/۳۲	۱۹۰	-	-	-	-	۵/۳۹	۶۹۱
		۲۹/۳	*۷/۷۹*	*۴۵*	-	-	-	-	*۱۳/۲۲*	*۳۱۹*
	۳ : ۰/۳		۵/۳۴	۳۰	-	-	-	-	۳/۲۵	۱۶۴
			۷/۰۶	*۲۱*	-	-	-	-	*۷/۶۱*	*۲۷*
	۳ :۰/۲		۱/۶۲	۲	-	-	-	-	۱/۶۴	۹
			۱/۳۵	*۱*	-	-	-	-	*۱/۲۳*	*۱*
									λ =۵۳۵	
چغندر قرمز	۳ : ۱	۰/۸	۱/۰۵	۱۰	۱/۲۰	۴	۱/۶۸	۴۴	۲/۱۱	۲۰۹
	۳ : ۰/۵		-	-	-	-	۱/۱۴	۱	۲/۰۱	۲۷
	۳ : ۰/۳		-	-	-	-	-	-	۱/۱۴	۲

مراجع

1- Abdullaev F.I.1993. Biological effects of saffron, Biofactors **4** 83–6.

2- Abdullaev F.I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.), Experimental Biology and Medicine **227** 20–5.

3- Corti P., Mazzei E., Ferri S., Franchi G.C., Dreassi E.1996.High-performance thin layer chromatographic quantitative analysis of picrocrocin and crocetin, active principles of saffron (*Crocus sativus* L.): a new method, Phytochemical Analysis **7** 201-203.

4- Hosseinzadeh H., Younesi H. 2002. Petal and stigma extracts of Crocus sativus L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice, BMC Pharmacology **2** 7-14.

5- Karimi G., Hosseinzadeh H., Khaleghpanah P. 2001. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic of Crocus sativus in mice, Iranian Journal of Basic Medical Sciences **4** 11–15.

6- Li N., Lin G., Kwan Y.W., Min D. 1999. Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A **849** 349–355.

7- Loskutov A.V., Beninger C.W., Hosfield G.L., Sink K.C. 2000. Development of an improved procedure for extraction and quantification of safranal in stigmas of *Crocus sativus* L. using high performance liquid chromatography, Food Chemistry **69** 87-95.

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

9- Lozano P., Delgado D., Gomez D., Rubio M., Iborra J.L. 2000. A non-destructive method to determine the safranal content of saffron *(Crocus sativus* L.) by supercritical carbon dioxide extraction combined with high-performance liquid chromatography and gas chromatography, Journal of Biochemical and Biophysical Methods **4328513-N** 367–378.

10- Negbi M. 1999. Saffron cultivation: past, present and future prospects, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 1–19.

11- Norbaek R., Kondo T. 1999. Flavonol glycosides from Flowers of Crocus specious and C. antalyensis, Phytochemistry **51** 1113-1119.

12- Norbaek R., Kondo T. 1999. Further anthocyanins from Flowers of Crocus antalyensis (*Iridaceae*), Phytochemistry **50** 325-328.

13- O'Neil C.A., Schwartz S.J. 1992. Chromatographic analysis of cis/trans carotenoid isomers, Journal of Chromatography A **624** 235-252.

14- Orfanou O., Tsimidou M. 1996. Evaluation of the colouring strength of saffron spice by UV-Vis spectrometry, Food Chemistry **57** 463-469.

15- Rios J.L., Recio M.C., M.Giner R., Manez S. 1996. An update review of saffron and its active constituents, Phytotherapy Research **10** 189-193.

16- Rödel W., Petrzika M. 1991. Analysis of the volatile components of saffron, HRC-Journal of High Resolution Chromatography **14** 771–774.

17- Sampathu S.R., Shivashanker S., Lewis Y.S. 1984. Saffron (*Crocus sativus* L.) cultivation, processing, chemistry and standardization, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition **20** 123-157.

18- Straubinger M., Bau B., Eckstein S., Fink M., Winterhalter P. 1998. Identification of novel glycosidic aroma precursors in saffron (*Crocus sativus* L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry **46** 3238–3243.

19- Sujata V., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V. 1992. Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetin, picrocrocin and safranal for the determination of the quality of spice using thin-layer chromatography, HPLC and GC, Journal of Chromatography A **624** 497–502.

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

21- Tarantilis P.A., Polissiou M., Manfait M. 1994. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection, Journal of Chromatography A **664** 55-61.

22- Tarantilis P.A., Tsoupras G., 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.

23- Tsimidou M., Tsatsaroni E. 1993. Stability of saffron pigments in aqueous extracts, Journal of Food Science **58** 1073-1075.

24- Winterhalter P., Straubinger M.S. 2000. Saffron-renewed interest in an ancient spice, Food Reviews International **16** 39–59.

25- Zalacain A., Ordoudi S.A., Blazquez I., Diaz-plaza E.M., Carmona M., Tsimidou M.Z., Alonso G.L. 2005. Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin, Food Additives and Contaminants **22** 607–615.

26- Zarghami N.S., Heinz D.E. 1971. The volatile constituents of saffron, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology **4** 43–45.

Identification of colored styles as one of the saffron adulterations with HPLC

B. Haghighi[1], J. Feyzi[2] and A. Hemmati Kakhki[3]

Abstract

High performance liquid chromatography (HPLC) with UV-visible detection was applied to identify adulterated saffron prepared by adding styles colored with the natural colorants extracted from saffron petals, safflower, madder and red beet to the pure saffron. The chromatograms of the methanol-water (50%, v/v) extracts of pure and adulterated saffron was obtained using a Nucleosil RP C_{18} column (5 μm) and a linear gradient from 20 to 80% methanol in water in 60 min with the flow rate of 1 ml min^{-1} at temperature 30°C. Two-way analysis of variance (ANOVA) was then applied to the HPLC data of the extracts of pure and adulterated saffron at the assayed wavelengths, 520 (or 254), 402 (or 254), 260 and 535 (or 440) nm and the presence of styles colored with the colorants of saffron petals (>9.1%, w/w), styles colored with the colorants of safflower (>14.3%), styles colored with the colorants of madder (>9.1%) and styles colored with the colorants of red beet (>14.3%) in saffron were significantly identified, respectively.

Keywords: Saffron, HPLC, adulterant, colored styles

1 -Associate Professor of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, P.O. Box 45195-1159, Gava Zang, Zanjan, Iran; E-Mail: haghighi@iasbs.ac.ir

2 -MSc of Analytical Chemistry, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, P.O. Box 45195-1159, Gava Zang, Zanjan, Iran.

3 -Msc of Food Science and Technology, Khorasan Science and Technology Park, P.O. Box 91735-139, Mashhad, Iran.