جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامهٔ پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۰ شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٤٠٧-٤١٦، (۱۳۸۳)

شناسایی کاروتنوییدهای گلیکوزیدی زعفران (*Croucus sativus*.L) به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

ابوالفضل کمرکی فراهانی[۱]، پروین بقایی[۱]، محمدباقر رضایی[۲] و کامکار جایمند[۲]

چکیده

زعفران کلاله خشک شده گونه *Croucus sativus*.L می‌باشد. کاروتنوییدها یکی از مهمترین ترکیبهایی هستند که در رژیم غذایی به‌عنوان خاصیت ضد سرطانی مطالعات بسیار وسیعی در مورد آن انجام شده است. اخیراً مشاهده شده است که ترکیبهای طبیعی در زعفران خاصیت ضد سرطانی خوبی دارند که از مهمترین ترکیبهای مؤثر زعفران می‌توان به ترکیبهای رنگی گلیکوزیدی آن که شامل دی- گلیکوز و دی- جنتیوبیوزیل استرهای کروستین مانند کروسین اشاره کرد که جزء کاروتنوییدهای محلول در آب هستند. در این تحقیق به استخراج، جداسازی و شناسایی کاروتنوییدهایی که جزء کاروتنوییدهای نادر محلول در آب می‌باشند، پرداخته شده است. استخراج توسط دستگاه سوکسله که این عمل در سه مرحله و توسط حلالهای پترولیوم اتر، دی اتیل اتر و متانول انجام گرفت. بعد از عمل استخراج، تغلیظ و جداسازی توسط کروماتوگرافی ستونی، صورت گرفت. نمونه‌ها به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در زمانهای بازداری ۰/٤۱، ۰/٦۳، ۰/۷۵، ۰/۹۸ جداسازی و توسط استاندارد شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: زعفران، کاروتنوییدهای گلیکوزیدی، سوکسله، کروماتوگرافی ستونی، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

۱- استادیار شیمی آلی دانشگاه صنعتی امیرکبیر - دانشکده شیمی
E-mail: farahani_epa@yahoo.com
۲- عضو هیأت علمی وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

زعفران کلاله‌های خشک شده گلهای گونه گیاهی *Croucus sativus*.L از خانواده Iridaceae و یکی از ارزشمندترین چاشنی‌های جهان می‌باشد (شکلهای شمارهٔ ۱ و ۲). زعفران از دیرباز به دلیل خواص دارویی و مصارف غذایی مورد توجه بوده است. این گیاه علاوه بر ایران که در حال حاضر حدود ۹۰٪ تولید جهانی را به خود اختصاص داده است (خبرنامه مرکز تحقیقات زعفران، ۱۳۸۱)، در بسیاری از کشورهای دیگر نظیر اسپانیا، یونان، هندوستان، مراکش و در حد جزیی در ایتالیا و چین کشت و تولید می‌گردد. بر مبنای تحقیقات علمی که در ادامه استفاده فراگیر از زعفران در طب سنتی و گیاهی انجام پذیرفته خواص متعدد زعفران و اثر بخشی ترکیبهای مؤثر آن توجه بسیار زیاد محققان و شرکتهای داروسازی و دست‌اندرکاران علم پزشکی را به خود جلب نموده است و از جمله این موارد می‌توان به مواردی همچون کمک به هضم غذایی، ضد نفخ، محرک و تقویت کننده تمایلات جنسی، مسکن به‌ویژه در درمانهای لثه و قلنج اشاره کرد. (خبرنامه مرکز تحقیقات زعفران، ۱۳۸۱).

یافته‌های اپیدمولوژیکی نشان می‌دهد که کاروتنوییدهای گلیکوزیدی زعفران (شکل شمارهٔ ۳) نظیر کروستین دارای خواصی همچون، ضد تومور، جمع‌کننده رادیکالهای آزاد (خاصیت ضد سرطانی)، درمان فشار خون، کاهش کلسترول، درمان کم خونی، افزایش جریان خون در شبکیه چشم و درمان اختلالات لکه زرد شبکیه چشم در اثر پیری می‌باشد (S.C.B. Pannikar, 1991 و H. Morijani, 1990). در این تحقیق به بررسی روشهای مختلف شیمیایی جهت شناسایی کاروتنوییدهای گلیکوزیدی موجود در زعفران ایرانی کشت شده در مزرعه‌ای در شهرستان قائنات پرداخته شده است. رنگهای اصلی زعفران ترکیبهای مونو و دی گلیکوزیل استر پلی ان دی کربوکسیلیک اسید کروستین می‌باشند که مشتقات D- گلیکوز و D- جنتیوبیوزیل به‌عنوان مشتقات کربوهیدراتی به آن متصل می‌باشند (Madam, 1966).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در این گروه از ترکیبها، دی جنتیوبیوزیل استر کروستین (کروسین) یکی از مهمترین ترکیبهایی است که به‌صورت محلول در آب بوده و به‌عنوان افزوده رنگی در صنعت غذایی بکار می‌رود. سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO) روش کروماتوگرافی لایه نازک را جهت شناسایی کمی و کیفی این ترکیبها معرفی می‌نماید (Hungary, 1978) که روشی سودمند برای تعیین رنگ و طعم‌دهنده‌ها می‌باشد.

مواد و روشها

۱- مواد شیمیایی و دستگاهها

متانول، دی اتیل اتر، پترولیوم اتر، اسید استیک، ان- بوتانول، اتیل استات، ایزوپروپانول، سیلیکاژل و صفحات TLC که همگی از شرکت مرک آلمان می‌باشد.

- دستگاه سوکسله شش خانه ساخت شرکت هاوارد آلمان (شکل شمارهٔ ٤)
- دستگاه تقطیر در خلاء گردشی Bouchi, Flawil, Switzerland (شکل شمارهٔ ٥)
- دستگاه خشک کردن نمونه ساخت شرکت ادوارد آلمان

۲- استخراج

الف- استخراج با سوکسله

برای استخراج ترکیبهای زعفران ابتدا مقدار ۲۰ گرم زعفران (جمع‌آوری شده از مزرعه‌ای در شهرستان قائنات از استان خراسان و تأیید شده توسط بخش گیاه‌شناسی مؤسسه) را پودر و داخل کاغذ صافی قرار می‌دهیم، سپس در مرحله اول با سوکسله (مخزن ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال پترولیوم اتر و نقطه جوش٦۰-٤۰ درجه سانتیگراد) کاروتنوییدهای غیر قندی و چربیها (نظیر لیکوپن و مشتقات آن) جدا می‌گردد. در مرحله دوم با حلال دی اتیل اتر ترکیبهای معطر زعفران (سفرانال و پیکروکروسین)

خارج شده و در مرحله نهایی و با استفاده از حلال متانول (۵۰۰ میلی‌لیتر) کاروتنوییدهای گلیکوزیدی مورد نظر استخراج می‌گردند (Jose luis, 1992, Petros A.Tarantilis.1994). تمامی این مراحل استخراج بر روی نمونه گلبرگ زعفران نیز صورت گرفت (شکل شماره ۶ نمونهٔ ۷).

ب- روش استخراج خواباندن در حلال

برای این کار مقدار ٤ میلی‌گرم از کلاله زعفران را برداشته و در بالون اول توسط ۲ میلی‌لیتر از مخلوط متانول: آب (۵۰:۵۰) ودر بالون دیگر همین مقدار نمونه توسط ۲ میلی‌لیتر از آب دیونیزه به مدت ۱۰ ساعت خوابانده می‌شود. هر چند وقت یکبار نمونه‌ها تکان داده می‌شوند. (N. Shantht, 1992, D. Baskeran, 1992). پس از پایان هر مرحله از استخراج نمونه‌ها توسط دستگاه تقطیر در خلاء گردشی تغلیظ و در نهایت با دستگاه فریز درایر خشک می‌گردد.

ج- جداسازی به روش کروماتوگرافی ستونی

برای جداسازی ترکیبهای رنگی زعفران از روش کروماتوگرافی ستونی با فاز متحرک: اتیل استات: ایزوپروپانول: آب (۲۰:۲۰:٦۰) و فاز ساکن: سیلیکاژل ٤۰ مرک با مش ۷۰-۲۳۰ (اندازه‌های ۰/٦۳-۰/۲۰ میلیمتر) استفاده گردید (Hanspeter, 1982). برای این کار ابتدا ستون به طول یک متر و قطر داخلی سه سانتیمتر را با سیلیکاژل پر نموده بعد مقدار یک گرم از نمونه خشک شده عصاره را در بالای ستون قرار داده و توسط حلال فاز متحرک و با سرعت عبور ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه عمل جداسازی آغاز گردید که در طی این روش تعداد ۱۱۵ فراکسون (۹ میلی‌لیتری) بدست آمد.

د- شناسایی کاروتنوییدهای گلیکوزیدهای به روش TLC

بعد از جداسازی نمونه‌ها توسط کروماتوگرافی ستونی مشخص گردید که فراکسیونهای ۲۹-۲۵ حاوی بیشترین مقدار کروستین و نمونه‌های ٦٠-٤٠ دارای بیشترین مقدار کاروتنوییدهای گلیکوزیدی می‌باشد. برای این کار نمونه‌ها را توسط سرنگ هامیلتون بر روی صفحات سیلیکاژل F254 از نوع ٦٠ مرک به عنوان مراحل ثابت لکه‌گذاری کرده، بعد صفحه داخل تانک حلال قرار داده می‌شود. برای این جداسازی از فاز متحرک ان- بوتانول: اسید استیک: آب (١:١:٤) استفاده گردید (V. Sujata, 1992, A.I. Vogel, 1955). بعد از آماده‌سازی صفحات TLC نمونه‌ها به ترتیب زیراز چپ به راست شماره‌گذاری شدند.

١) زعفران سوکسله شده قبل ازکروماتوگرافی ستونی

٢) زعفران حل شده در ٢ میلی‌لیتر مخلوط متانول:آب (٥٠:٥٠)

٣) زعفران حل شده در ٢ میلی‌لیتر آب دیونیزه

٤) فراکسیون ٢٧ کروماتوگرافی ستونی

٥) فراکسیون ٥٠ کروماتوگرافی ستونی

٦) فراکسیون ٧٠ کروماتوگرافی ستونی

٧) گلبرگ زعفران

٨) استاندارد کروستین این نمونه‌ها در شکل شمارهٔ ٥ و نتایج آن در جدول شمارهٔ ١ آورده شده است.

نتایج

نتایج این امر در کروماتوگرام شکل شمارهٔ ٦ در نقاط ١، ٢، ٣، ۴ و ٥ مشاهده می‌گردد. در این کروماتوگرام ترکیبها به چند گروه تقسیم می‌شوند. یکسری از این ترکیبها در Rt =0.47 جداسازی می‌شوند و با توجه به ساختار این ترکیب که در شکل شمارهٔ ٣

آورده شده است، مشاهده می‌گردد که ترکیب A-Crocin با دو گروه عاملی جنتیوبیوزیلی (قندی) و به سبب قطبیت بالاتر این ترکیب و برهمکنش بیشتر آن با فاز متحرک که قطبی نیز می‌باشد به راحتی جداسازی می‌گردد که این ترکیب در مقایسه با سایر مراجع مورد تأیید قرار گرفته است (V. Sujata, 1992, A.I. Vogel, 1955, E. Leselier. 1993) و در نمونه‌های ۱، ۲، ۵ و ٦ مشاهده می‌شود و نشان دهنده آن است که نمونه‌های ۱ و ۲ با توجه به استخراج توسط سوکسله (حلال متانول) و روش خواباندن در حلال متانول، آب این ترکیب به راحتی جداسازی گردیده است و دقیقاً همین باعث تأیید روش استخراج با حلال آب دیونیزه اثری از ترکیب کروسین نمی‌باشد و این امر قابل پیش‌بینی می‌باشد، چرا که وجود چربیهای کاروتنوییدی و معطر در زعفران مانع از جداسازی این ترکیب گردیده است، در حالی که با افزودن حلال متانول به نسبت مساوی به آب عمل استخراج کمی بهبود یافته است. در Rt =0.64 و Rt =0.75 به ترتیب ترکیبهای B-Crocin و D-Crocin می‌باشند که ترکیب B-Crocin دارای دو گروه دی گلیکوزیل با قطبیت بیشتر نسبت به یک گروه جنتیوبیوزیل و یک گروه گلیکوزیل در D-Crocin و قطبیت کمتر نسبت به A-Crocin می‌باشد و در نهایت Rt =0.94 و Rt =0.98 ترکیبهای کروستینی مونو جنیوبیوزیل کروستین C-Crocin و خود Crocetin ظاهر گردیدند که ترکیب کروستین با توجه به وجود استاندارد آن به راحتی مورد تأیید قرار گرفته است. در جدول شمارهٔ ۱ ترکیبهای مختلف زعفران همراه زمان بازداری آنها نمایش داده شده است.

جدول شمارهٔ ۱- شناسایی ترکیبهای گلیکوزیدی زعفران به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

Component	*Retention Time*	*Mode of detection*
A-Crocin	0.41	Visible light
B-Crocin	0.64	Visible light
C- Crocin	0.75	Visible light
D-Crocin	0.94	Visible light
Crocetin	0.98	Visible light

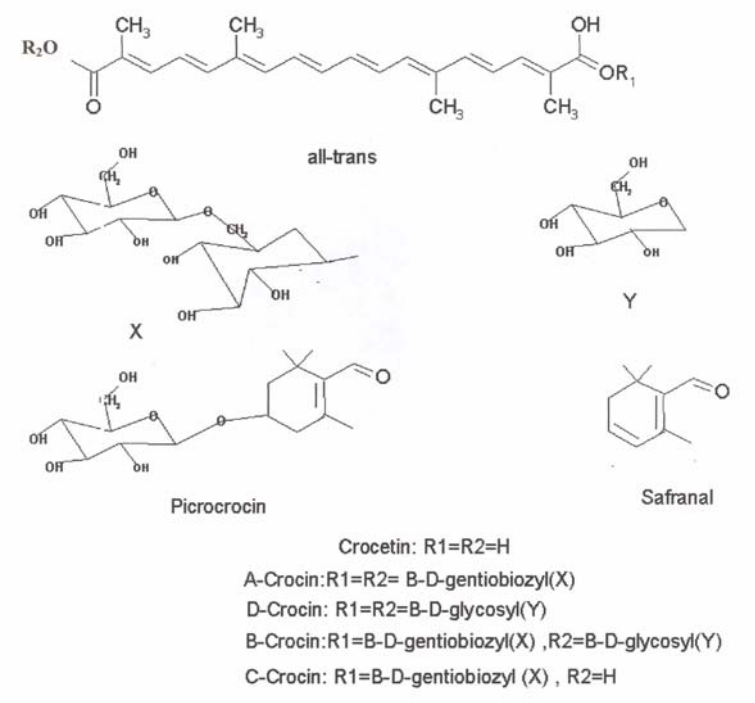
بحث

طبق این گزارش و نتایج بدست آمده در کشورهای مختلف امکان جداسازی ترکیبهای دارویی زعفران وجود دارد که این امر توسط دستگاههای مختلف کروماتوگرافی صورت گرفته است (٦ و ٧). با توجه به روشهای مختلف استخراج (استخراج با سوکسله و استخراج به روش خواباندن در حلال) و کروماتوگرام آنها مشاهده می‌گردد که استخراج با سوکسله از کارایی بالاتری برخوردار بوده، چرا که در این روش ابتدا چربیها و اسانسهای معطر از زعفران خارج شده و در مرحله دوم با حلال قطبی متانول کاروتنوییدهای گلیکوزیدی قندی به راحتی جدا می‌شوند ولی در روش مستقیم خواباندن در حلال امکان استخراج چربیها وجود ندارد و به‌عنوان وجود این مزاحمت‌ها مانع از استخراج کامل کاروتنوییدهای قطبی قندی می‌گردد.

با روش کروماتوگرافی ستونی ترکیبها را با توجه به نوع قطبیت آنها می‌توان جداسازی نموده تا در هنگام شناسایی با کروماتوگرافی لایه نازک از مزاحمت‌های کمتری برخوردار بود. از نکات قابل توجه در کروماتوگرام شکل شمارهٔ ۶ می‌توان به گلبرگ زعفران اشاره داشت و همان گونه که مشاهده می‌شود هیچ‌گونه آثاری از ترکیبهای رنگی گلیکوزیدی در آن مشاهده نمی‌گردد که این امر با توجه به رنگ ظاهری آن امری بدیهی به نظر می‌رسید. امروزه در صنعت رنگهای افزودنی غذایی، به‌خصوص در مورد زعفران با تقلبات فراوانی مواجه هستیم که استفاده از این تکنیک ساده و دقیق روشی مؤثر در بررسی نوع رنگها و تقلبات زعفران کاربرد وسیعی خواهد داشت، چرا که ترکیبهای رنگی افزوده شده از کشیدگی رنگی در طول صفحه برخوردار خواهند بود که این امر در مورد گلبرگ زعفران به وضوح دیده می‌شود (شکل شمارهٔ ۶ نمونهٔ ۷).

شکل شمارهٔ ۱- کلاله و گلبرگ زعفران

شکل شمارهٔ ۲- کلاله خشک شده زعفران



شکل شمارهٔ ۳- ساختار شیمیایی ترکیبهای زعفران

شکل شمارهٔ ٤- دستگاه سوکسله شش خانه

شکل شمارهٔ ٥- دستگاه تقطیر در خلاء گردشی

شکل شمارهٔ ٦- کروماتوگرام ترکیبهای رنگی زعفران روی TLC

منابع مورد استفاده

- خبرنامه مرکز اطلاعات و تحقیقات زعفران در سیزدهمین سمینار صنایع غذایی در دانشگاه امیرکبیر (مهرماه ۱۳۸۱).
- E. Liselier, A. Tchapla, C. Marty and A. Lebert. 1993. saffron chemoprevention in biology and medicine. J. Chromatogr. 633.9.
- Hanspeter P. Martin Rychener. 1982. Separation Cis/Trans Crocetin esters with HPLC. J. Chromatogr. 234. 443-447.
- Hungary, Draft international Standard, Saffron- Specification, ISO/DIS 3532.2, 1978 (final standard 3632, 1980).
- H. Morijani, Tarantilis. 1990. inhibitory effect of crocetin on benzo (a) pyrene genotoxicity and neoplastic. 10. 1398.
- International Organization for standardization, Hungry, 1978. Iso 3632, 1980.
- Madam G, Aloose, L, Varon, R., Gomez, R. 1966. Auto oxidation in saffron at 40 and 75% relative humity. J.Food Sci.55. 595.
- N. Shanthi, Nagin Chand. 1992, TLC preparative purification of picrocrocin, HTCC and crocin from saffron. J. Food Qual., 15, No.4.
- Petros A. Tarantilis.1994.Separation of cis and trans crocin of saffron using HPLC. J. of Chrom A. 664. 55-61.
- P. Tarantilis, M. Polissiou1992.in vitro studies on the selective cytotoxic effect of crocetin and quercetion. Anti cancer Res. 12. 1889.
- S.C.B. Pannikar.1991. protective effects of crocetin on the blandder toxicity induced by cyclophosphamide. Cancer Lett.57.109.
- V. Sujata, G.A. Ravishankar. 1992. Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin and crocetin by TLC and HPLC. J. of Chrom. 664. 497-502.