

به کارگیری روش کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی (HPLC) در تعیین مقادیر ساfranال به عنوان فاکتور کیفیت عطر زعفران ایرانی و مقایسه آن با روش اسپکتروفتومتری

حمیدرضا فلاحت پیشه^{۱*}، محمد تقی مظلومی^۲، رزیتا کمیلی فنود^۳ و فریبا سید احمدیان^۴

۱- پژوهشیار انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- دانش آموخته کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- کارشناس علوم تغذیه، آزمایشگاه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- کارشناس علوم و صنایع غذایی، آزمایشگاه تحقیقات صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

زعفران از کالاهای خشک شده گونه *Crocus sativus L.* به دست می آید. به دلیل وجود برخی شباهت در روش استاندارد بین المللی و استانداردهای ایران در اندازه گیری مقادیر ساfranال در زعفران اقدام به راه اندازی یک روش تغییر یافته بر پایه کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی (HPLC) برای اندازه گیری ساfranال کردیم. در این روش ۰/۱ g نمونه ساییده شده سه بار با اتانول ۸۰٪ استخراج شد و پس از آن بلافاصله به دستگاه HPLC تزریق گردید. مراحل استخراج سریع (۳۰ دقیقه) و مراحل کروماتوگرافی علاوه بر سریع بودن (۵ دقیقه) تکرار پذیر و دقیق بودند (146 ± 9 ppm). حداقل میزان قابل شناسایی $0.13 \mu\text{g/ml}$ ، و متوسط درصد بازیابی ($n=5$) برای غلظتهای گوناگون استاندارد افزوده شده به نمونه های زعفران ۱۴/۱۰۱٪ بود ضمن آنکه روش فوق تا ۱۰ ppm کاملاً خطی بود. از هر دو روش HPLC و طیف نور سنجی برای تعیین ساfranال بر حسب وزن خشک در نمونه های زعفران خشک شده با چهار روش گوناگون (آون خلاء، خورشیدی، ماکروویو و سنتی) استفاده شد. با مقایسه نتایج، به ویژه در نمونه های سنتی ارجحیت روش HPLC و خطای احتمالی ناشی از هم پوشانی سایر ترکیبات در اندازه گیری ساfranال به روش طیف نور سنجی آشکار شد.

کلید واژگان: زعفران، ساfranال، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا، طیف نور سنجی

* مسؤول مکاتبات مقاله: info@nftif.org

۱- مقدمه

زعفران گران‌ترین و با ارزش‌ترین ادویه جهان از کلاله‌های خشک شده گونه *Crocus sativus L.* به دست می‌آید [۱، ۲]. ایران به تنهایی ۷۵-۷۸ درصد تولید جهانی این محصول را در اختیار دارد ولی به دلایل گوناگون ۱۰-۲۵ درصد از سود واقعی آن نصیب کشور ما می‌شود [۳، ۴].

سافرانال ماده‌ای آلدئیدی است که معیار کیفیت عطر زعفران می‌باشد [۵، ۶]. وینترهالتر^۱ و استرابینگر^۲ اخیراً در یک مقاله مروری به بررسی تاریخچه تولید زعفران، کاربردهای سنتی زعفران در غذاها و نوشابه‌ها، اهمیت پیکروکروسین^۳، ترکیبات عطری، پیش‌سازهای آنها و ترکیبات فرار زعفران و نیز ترکیبات ایجاد کننده رنگ و روش تجزیه ترکیبات زعفران پرداخته‌اند [۷]. آلونسو^۴ و همکاران در یکی از آخرین بررسی‌های انجام شده به مقایسه میزان سافرانال در نمونه‌های اسپانیایی با نمونه‌هایی از ایران، هند و ایتالیا پرداخته‌اند. آنها از هردو روش گازکروماتوگرافی و طیف سنجی استفاده، و نتیجه‌گیری کردند که نمونه‌های ایرانی به دلیل نوع فرایند خشک کردن پایین‌ترین میزان سافرانال را دارا هستند [۸]. روش استاندارد ملی ایران که بر گرفته از روش استاندارد جهانی (ISO-3632) می‌باشد مبتنی بر طیف سنجی در طول موج ۳۳۰ nm است که به گفته سایر محققان چندان تکرار پذیر و قابل اعتماد نیست [۸، ۹]. روش کروماتوگرافی بخصوص روش کروماتوگرافی با کارکرد عالی (HPLC) به دلیل قابلیت جداسازی و اندازه‌گیری تک تک اجزا بسیار اختصاصی بوده و از دقت بالایی برخوردار می‌باشد؛ هر چند، در نوع روش استخراج سافرانال پیش از کروماتوگرافی هنوز نقطه مشترکی وجود ندارد [۱۰، ۱۱، ۱۲]. اما در این پژوهش سعی این بوده است تا با توجه به تلاشهای سایر پژوهشگران به مقایسه بین دو روش اندازه‌گیری سافرانال یعنی طیف نورسنجی و کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی در زعفران خشک شده به

روشهای مختلف به‌طور همزمان پرداخته شود تا بر اساس نتایج حاصله بتوان نسبت به ضرورت بازبینی در روش استاندارد ملی تاکید کرد. در بیست و یکمین کمیته فنی تدوین استاندارد ادویه و چاشنیها (۲۰۰۲ اسپانیا) پیشنهاد برای تجدید نظر در استاندارد زعفران ارائه شد که بر اساس آن موضوع همپوشانی عطر و طعم و رنگ زعفران با دو روش طیف سنجی و کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی مطرح شد. هر چند که بحث اصلی بهبود کیفیت اندازه‌گیری رنگ زعفران بوده است اما به هر حال این خود می‌تواند نشانه‌ای بر عزم جهانی در بهبود روشهای اندازه‌گیری عطر و رنگ زعفران باشد.

۲- مواد و روشها

مواد به کار گرفته شده عبارت بودند از

۱- اتانول مرکب ۹۹٪، استون نیتریل مرکب ۹۹/۵٪، استاندارد سافرانال سنتزی از سوپلکو^۵ (آمریکا) ۹۰٪ و کلاله زعفران خشک و تازه مربوط به قائن و گناباد در استان خراسان.

۲-۱- نحوه نمونه‌گیری

ابتدا دو مزرعه از مناطق کشت زعفران قائن و گناباد به‌طور تصادفی انتخاب شدند و در هر مرحله نمونه‌گیری، مجموع گل‌های چیده شده هر مزرعه مخلوط شدند. گل‌های چیده شده به همان حالت در کارتنهای منفذدار بدون آنکه انباشته شوند به انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور حمل شدند در آنجا با دستکش استریل عملیات جدا کردن کلاله‌ها انجام می‌گرفت و در نهایت پس از مخلوط کردن کلاله‌ها نمونه‌های لازم برای انجام فرایندهای گوناگون خشک کردن جدا و سپس فرایند خشک کردن انجام گرفت.

نمونه‌های خشک شده برای انجام مراحل اندازه‌گیری سافرانال به آزمایشگاه HPLC انتقال یافت.

1. Winterhalter
2. Strabinger
3. Pikrokrosin
4. Alounso

5. Supelco

۲-۲- اندازه‌گیری سافرانال با روش طیف سنجی

این عملیات دقیقاً بر پایه استاندارد ملی ایران (۲۵۹-۲) انجام گرفت.

۲-۳- اندازه‌گیری سافرانال با روش HPLC

دستگاه HPLC استفاده شده دارای اجزای زیر بود:

- ۱- پمپ مدل ۵۱۰ واترز آمریکا
- ۲- کنترل گر گرادیانی مدل ۷۴۶ واترز آمریکا
- ۳- تزریق کننده دستی رتوداین آمریکا
- ۴- ستون Novapack C18 به ابعاد ۱۵۰×۳/۹ mm و قطر ذرات ۴ μm آمریکا
- ۵- آشکارساز UV-VIS مدل ۴۸۶ واترز آمریکا
- ۶- نرم افزار کروماتوگرافی Autochro-2000 - ساخت کره جنوبی
- ۷- سرنگ هاملتون ۲۵ μl

۲-۴- نحوه آماده سازی نمونه برای استخراج

سافرانال از کلالة‌های خشک شده

۱۰۰ mg از نمونه خشک شده زعفران کاملاً ساییده شده را در یک لوله آزمایش ۱۰ ml با ۵ ml اتانول ۸۰٪ با آب (V/V) مخلوط شده و یک دقیقه به شدت ورتکس شد. آنگاه ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد و فاز رویی جدا و به یک لوله ۲۵ ml انتقال یافت. این عمل دوبار دیگر و هر بار با ۵ ml اتانول ۸۰٪ انجام شد. ۲۰ μl از فازهای جدا شده در لوله ۲۵ ml به دستگاه HPLC تزریق شد.

برای اندازه‌گیری سافرانال شستشوی ایزوکراتیک^۱ با یک پمپ به وسیله فاز متحرک با ترکیب نسبتی ۷۶:۲۴ از آب: استونیتریل و با سرعت جریان ۰/۵ ml بر دقیقه استفاده شد. طول موج آشکارساز روی $\lambda=308$ nm تنظیم شده بود.

1. Isocratic

۲-۵- منحنی استاندارد سافرانال

ابتدا ۱۰ μl از استاندارد سافرانال با خلوص ۹۰٪ را با ۱۰ ml اتانول ۸۰٪ رقیق کرده و با توجه به اینکه دانسیته استاندارد خالص ۹۶۶ kg/L است، غلظت این محلول حدود ۹۶۶ ppm خواهد شد. این محلول، محلول مادر ۱ بوده و از رقیق سازی آن سایر استانداردها تهیه شد. غلظتهای ۰/۱۲، ۰/۲، ۲/۴، ۴/۸ و ۹/۶ ppm از سافرانال و در اتانول ۸۰٪ تهیه شد و ۲۰ μl از هر کدام به دستگاه HPLC تزریق شد. سپس با روش استاندارد خارجی و از طریق محاسبه مساحت زیر پیک سافرانال در نمونه‌های استاندارد نسبت به غلظت نمونه‌های استاندارد بر حسب ppm منحنی استاندارد رسم شد.

چگونگی محاسبه مقدار سافرانال موجود در نمونه‌های زعفران بر حسب ppm وزن خشک زعفران به قرار زیر بود:

$$M = C_L \times 15$$

$$M$$

$$C_w = \frac{M}{(100-h)} \times 0/1$$

M - مقدار سافرانال موجود در ۰/۱ g نمونه زعفران برحسب میکروگرم

C_L - غلظت به دست آمده از منحنی استاندارد بر حسب μg/ml

C_w - مقدار سافرانال موجود در وزن خشک زعفران برحسب

mg/kg

h - درصد رطوبت نمونه

توضیح: عدد ۱۵ ضریب رقت و عدد ۰/۱ میزان نمونه اولیه وزن شده است.

۳- نتایج و بحث

نتایج مربوط به رسم منحنی رگرسیون استاندارد نشان داد بین ۰ تا ۱۰ ppm رابطه بین غلظت و پاسخ آشکار ساز خطی است. منحنی خط رگرسیون برای تزریق محلول استاندارد خالص عبارت بود از $y = 0/0002x + 0/0458x$ که ضریب همبستگی آن

معادل ۰/۹۹۵۴ کاملاً نزدیک به ۱ بوده همچنین معادله خط رگرسیون برای استانداردهای خالص افزوده شده به نمونه زعفران نیز به همان شکل به دست آمد که عبارت بود از $y = 0.0438 + 0.1113x$ در این حالت ضریب همبستگی بین نقاط معادل ۰/۹۹۵۱ به دست آمد. همانطور که دیده می‌شود شیب هر دو خط بسیار به هم نزدیک می‌باشند که نشانه خوبی از بالا بودن میزان درصد بازیافت در این روش است از طرفی ضرایب همبستگی نقاط هم تقریباً مشابه هم می‌باشد که نشان‌دهنده آن است که از منحنی استاندارد خالص با قاطعیت می‌توان برای محاسبه میزان سافرانال در نمونه‌های زعفران استفاده کرد.

حد تشخیص روش (Detection limit) پس از رقیق سازی مکرر محلول استاندارد ۹/۶ $\mu\text{g/ml}$ به دست آمد. به این شکل که رقیق سازی تا جایی ادامه یافت که عملاً پیک حاصل در محدوده زمان بازداری سافرانال از نويز خط پایه قابل شناسایی نبود در این حالت سطح زیر پیک نويز محاسبه و سه برابر شد که پس از قرار دادن در معادله خط رگرسیون مربوط به منحنی استاندارد به عنوان حد تشخیص در نظر گرفته شد که معادل

۰/۰۱۳ ppm بود. برای محاسبه تکرارپذیری روش نیز یک نمونه زعفران ۵ بار استخراج و سپس به دستگاه HPLC تزریق شد و مقادیر سافرانال آنها برحسب ppm وزن خشک محاسبه شد. میزان RSD% برای تکرار پذیری ۶/۲٪ بود که با توجه به احتمال تبدیل پیکروکروسین به سافرانال تکرار پذیری آن قابل قبول به نظر می‌رسد و نشان می‌دهد کنترل زمان میزان خطای ناشی از تولید احتمالی سافرانال را به حداقل رسانده است.

برای شناسایی دقیق پیک سافرانال اقدام به افزودن استاندارد سافرانال به نمونه زعفران کردیم تا مطمئن شویم پیک سافرانال دقیقاً همان است که فکر می‌شد. برای این منظور به ۰/۱ g نمونه ساییده شده زعفران ۰/۵ ml از هر یک از محلولهای استاندارد به کار گرفته شده در رسم منحنی استاندارد افزوده شدند. پس از استخراج نمونه‌های فوق و تزریق آنها به دستگاه HPLC سطح زیر پیک سافرانال با سطح زیر پیک نمونه زعفران تنها مقایسه شد. این کار برای اطمینان بیشتر برای هر غلظت استاندارد پنج بار تکرار شد. از نتایج به دست آمده درصد بازیافت برای هر غلظت نیز محاسبه شد (جدول ۱).

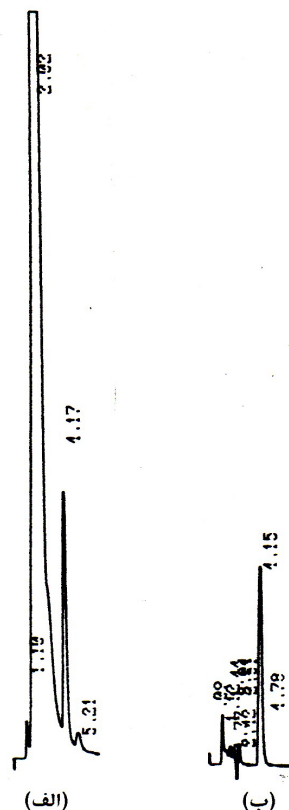
جدول ۱ نتایج ۵ تکرار درصد بازیابی سافرانال پس از افزودن غلظتهای گوناگون استاندارد به نمونه‌های زعفران خشک

نمونه‌ها	سطح زیر پیک نمونه تنها	سطح زیر پیک استاندارد اضافه شده	سطح زیر پیک نمونه + استاندارد	درصد بازیافت	درصد ضریب تغییرات
نمونه ۱	۰/۱۰۳۶۶	۰/۰۰۶	۰/۱۱۲۹	٪ ۱۰۳	٪ ۴/۴۵
نمونه ۲	۰/۱۰۳۹	۰/۰۵۸	۰/۱۶۶۹	٪ ۱۰۳/۱	٪ ۵/۸۶
نمونه ۳	۰/۱۰۴۷	۰/۱۲	۰/۲۲۹۹	٪ ۱۰۲/۳	٪ ۳/۹
نمونه ۴	۰/۱۰۴	۰/۲	۰/۳۰۴	٪ ۱۰۰	٪ ۷/۵
نمونه ۵	۰/۱۰۲۱	۰/۴۵	۰/۵۴۰۱	٪ ۹۷/۳	٪ ۷

نتایج میزان سافرانال در نمونه‌های خشک شده با روشهای گوناگون خشک کردن با دو روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی و طیف سنجی نیز در شکلهای ۲ و ۳ آورده شده است. در کروماتوگرام، سافرانال در زمان ۴/۱۷ دقیقه از ستون خارج و در برخی از نمونه‌ها پیک کوچک دیگری که احتمالاً مربوط به

بتاسیکلوسیترال^۱ است پس از آن از ستون خارج می‌شود (شکل ۱).

1. Betasiklositral



شکل ۱ کروماتوگرام مربوط به سافرانال در الف) نمونه زعفران، زمان بازداری ۴/۱۷ دقیقه، ب) نمونه استاندارد با غلظت ۴/۸ ppm، زمان

ترجیح داده شد که فرایند استخراج حداقل زمان ممکن را داشته باشد به این دلیل مرحله جداسازی رنگدانه‌ها با روش SPE حذف شد. خوشبختانه این عمل باعث ایجاد هیچگونه مزاحمتی در جریان کروماتوگرافی نشد. از طرفی نیاز به تغلیظ هم احساس نشد. و چون به کارگیری دمای بالاتر از دمای محیط احتمالاً باعث تبخیر و افزایش غلظت سافرانال می‌شود، از این کار صرف نظر گردید. با این تفاسیر زمان لازم برای استخراج به ۳۰ دقیقه کاهش یافت. لوسکاتو^۲ و همکارانش ضمن ارائه روشی برای استخراج اختصاصی سافرانال با استونیتریل صددرصد به مقایسه روش

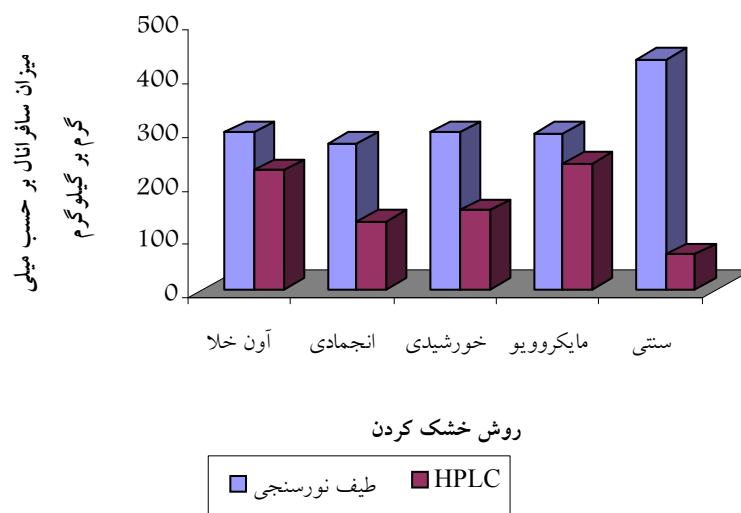
متانول و اتانول همراه آب با درصدهای گوناگون برای استخراج سافرانال و آلفا کروسین استفاده شده است [۹، ۱۲]. به کارگیری دمای بالاتر از محیط نیز در مواردی برای تسریع استخراج سافرانال زعفران به کار گرفته شده است [۱۳]. سوجاتو^۱ و همکارانش ضمن استفاده از مخلوط اتانول و آب (۸۰٪) اقدام به جداسازی رنگدانه‌های زعفران با روش استخراج روی فاز جامد (SPE) و سپس تغلیظ نمونه و حذف حلالها اقدام به تبخیر حلال در دستگاه تبخیر کننده چرخان و تحت گاز ازت کردند [۷]. در روش به کار گرفته شده در این آزمایشگاه

2. Looskato

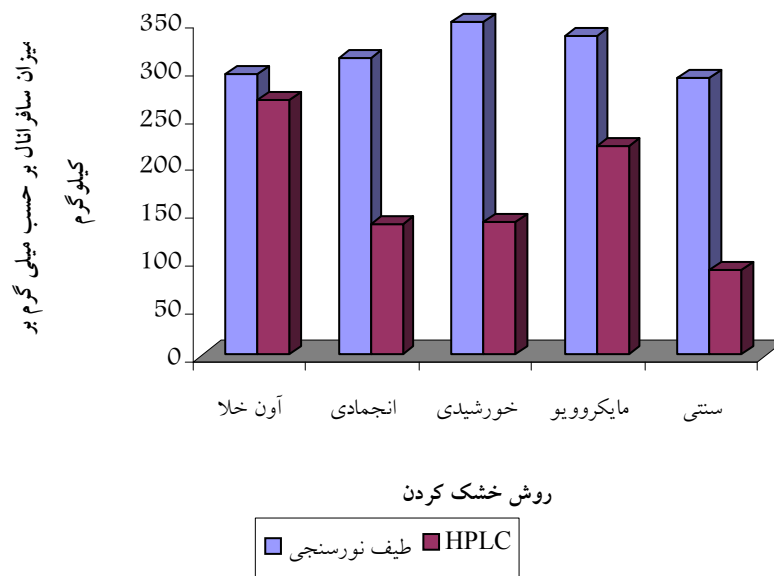
1. Soujato

مشخصی در روند تغییرات سافرانال و نوع روش خشک کردن دیده نمی‌شود ضمن آن که میزان سافرانال نمونه‌های خشک شده به روش سنتی بسیار بالاست اما در روش HPLC ضمن وجود اختلاف معنادار بین روشهای گوناگون خشک کردن در هر دو شهر قائن و گناباد وجود الگوی مشخص در روند تغییرات سافرانال کاملاً به چشم می‌خورد که خود می‌تواند نشان دهنده دقت و کارایی روش HPLC باشد. نکته مهم دیگر آن بود که نمونه‌های سنتی بر خلاف روش طیف سنجی میزان سافرانال بسیار پایین‌تری داشتند و اگر این موضوع را که در طول موج ۳۳۰ نانومتر سیس کروسین همراه با سافرانال جذب خواهد داشت بپذیریم. بنابراین باید گفت در روش طیف سنجی میزان سافرانال به‌طور کاذب افزایش یافته است [۱۴، ۱۰]. با توجه به بالا بودن میزان سافرانال اندازه‌گیری شده در نمونه‌های خشک شده با روش سنتی در روش طیف سنجی شاید بتوان گفت میزان تولید سیس کروسین در روش خشک کردن سنتی بالاتر از دیگر روشهای خشک کردن می‌باشد.

خود با روش سوجاتو و همکاریانش پرداخته است. آنها اعلام کردند سه بار استخراج با استونیتریل ۱۰۰٪ مانع از استخراج پیکرو کروسین شده و احتمالاً آنزیم بتا گلوکوزیداز را نیز خاموش می‌نماید. در این روش نیز دو فرایند SPE و تبخیر حلال حذف شده است؛ اما اشاره شده به کارگیری مخلوط اتانل ۸۰٪ با آب پس از ۶ ساعت از شروع استخراج میزان سافرانال اندازه‌گیری شده در یک نمونه را حدود ۱۱٪ افزایش می‌دهد [۱۱]. اگر این موضوع درست باشد با توجه به کاهش زمان استخراج تا ۳۰ دقیقه در روش استفاده شده ما و تزریق بلافاصله نمونه‌ها به دستگاه HPLC می‌توان گفت خطا از ۱۰۰٪ در روش سوجاتو به حدود ۸٪ کاهش پیدا کرده است. استونیتریل ۱۰۰٪ به دلیل قدرت آبگیری بالا برای استخراج سافرانال از کلانله‌های تازه کارایی بالاتری خواهد داشت؛ زیرا کلانله‌های تازه قابل سایش نبوده اما در مجاورت استونیتریل ۱۰۰٪ خشک شده و به راحتی خرد می‌شوند. با مشاهده شکلهای ۲ و ۳ می‌توان دید در روش طیف سنجی (روش استاندارد ملی ایران) هیچگونه الگوی



شکل ۲ مقایسه دو روش HPLC و طیف نورسنجی در نمونه‌های زعفران خشک شده با چهار روش مختلف بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم (گناباد)



شکل ۳ مقایسه دو روش HPLC و طیف نورسنجی در نمونه‌های زعفران خشک شده با چهار روش مختلف بر حسب

میلی گرم بر کیلو گرم، قائن

۶- منابع

- [1] Ibbora JL, Castellar MR, Canovas M, Majon A. Analysis of a packed bed reactor for hydrolysis of picrocrocin by immobilized β -glucosidase. Enzyme microbial technology. 1993; 15:780-84.
- [2] Lozano P, Castellar MR, Simancas MJ, Ibbora JL. Quantitative high performance liquid chromatographic method to analysis of commercial saffron (*crocus sativus* L.) products. Journal of chromatography A 1999; 830: 477-783.
- [3] Ibbora JL, Castellar MR, Canovas M, Majon A. Journal of Food Science 1992; 57(3): 714-716.

۴- نتیجه گیری

روش طیف نورسنجی برای اندازه‌گیری سافرانال که به‌وسیله سازمان استاندارد جهانی ارائه شده و به‌عنوان استاندارد ملی ایران پذیرفته شده است با توجه به نتایج حاصله تکرارپذیر و رضایت بخش نیست و تجدید نظر در آن لازم است. بنابراین با توجه به تجدید نظر در روش اندازه‌گیری رنگ به نظر می‌رسد روش اندازه‌گیری عطر زعفران نیز می‌بایستی مورد تجدید نظر قرار بگیرد به هر حال تلاش در راستای بهبود هر چه بیشتر شرایط استخراج ترکیبات عطر و رنگ با هر دو روش HPLC و طیف نورسنجی می‌بایستی ادامه یافته تا امکان اندازه‌گیری سریع‌تر و دقیق‌تر فراهم شود.

۵- تشکر و قدر دانی

از همه کارشناسان گروه تحقیقات صنایع غذایی و سرکار خانم چوبدار به‌دلیل همکاری صمیمانه آنها قدردانی می‌گردد.

- [۴] اقتصاد آسیا. ماهنامه بین المللی اقتصادی بازرگانی. ۱۳۸۰؛ سال ۹: (۴۲۶) صص ۴، ۳، ۵؛
- [۵] زعفران. نشریه داخلی اتحادیه تعاونیهای کشاورزی زعفرانکاران ایران ۱۳۷۶؛ سال ۱: (۳) صص ۵-۲.
- [6] ISO. Saffron (*Crocuse Sativuse* Linnaeus): (b) ISO-(E) Part 12-test methods. International Organization for Standardization, Geneva 1993; 3632-2.
- [7] Alonso JL, Salinas MR, Sanchez-Fernandez MA, Garijo J. Safranal content in spanish saffron. Food science and Technology International. 2001; 7(3): 225-229.
- [8] Winterhalter P, Straubinger M. Saffron-renewed interest in an ancient spice. Food Reviews International. 2000; 16(1): 39-59.
- [۹] استاندارد ملی ایران. زعفران - روشهای آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تجدید نظر دوم. چاپ ششم ۱۳۷۴؛ شماره ۲-۲۵۹.
- [10] Sujata V, Ravishankar GA, Venkatarman LV. Methods for the analysis of saffron metabolites crocin, crocetin, picrocrocin and safranal for the determination of quality of spice using thin layer chromatography, HPLC and Gas chromatography. Journal of Chromatography 1992; 624: 497-502.
- [11] Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans crocins and safranal of saffron by HPLC and photodiode array detection. Journal of Chromatography A 1994; 664: 55-61.
- [12] Loskutov AV, Beninger CW, Hosfield GL, Sink KC. Development of an improved procedure for extraction and quantitation of safranal in stigmas of *crocus sativus* L. using high performance liquid chromatography. Food chemistry 2000; 69:87-95.
- [13] Morimoto S, Umezaki Y, Shoyama Y, Soita H, Nishi K, Irino N. Postharvest degradation of carotenoid glucose ester in saffron. Plant Medicine 1994; 60: 4340-388.
- [14] Tarantilis PA, Polissiou M, Tsoupras G. Determination of saffron components in crude plant extract using HPLC-UV-VIS photodiode array and mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1995; 669: 107-118.
- [15] Solinas M, Cichelli A. Analisi HPLC compositeresponsibili del colore dell aromadello zafferano. Industri Alimentari. 1988; 27:634-639.
- [16] Orfanou O, Tsimidou M. Evaluation of the coloring strength of saffron spice by UV-VIS spectrometry. Food Chemistry 1995; 57(3): 463-469.

Comparison of HPLC and Spectrophotometric methods for Determination of Safranal as the aroma quality of Iranian Saffron

Falahatpishe H.^{1*}, Mazloumi M.T.², Komeili Phonoud R.² & Seyyed Ahmadian F.²

- 1- Assistant Researcher , Department of Food Science and Technology, National Nutrition & Food technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Science & Health Services, Tehran, Iran.
- 2- Food Technologist , National Nutrition & Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Science & Health Services, Tehran, Iran.

Saffron consists of dried stigmas of *Crocus Sativus L.* Three times of extraction by ethanol/deionized water (80/20) have been used for sample preparation and immediately injected to HPLC for saffranal (main aroma component of saffron) determinations. The method was modified by omitting solvent evaporation and solid phase extraction, which was fast and reproducible (146 ± 9 mg/kg) with the minimum detectability was 0.013 ppm and the average recovery 101.14%. The method was linear up to 10ppm. Saffron samples were from two famous producer cities in khorasan , Ghaen and Ghonabad. Four different drying methods (Vaccum Oven, Macrowave, Solar and Traditional) were used for drying the stigmatas. Each of the two analysis methods (HPLC & Spectrophotometric) was used for determination of saffranal in the dried stigmas. Comparison between the two analytical methods specially by focusing on the traditional samples revealed that spectrophotometric method should be replaced by HPLC or modified to receive better selectivity.

Key Words: Saffron , Safranal , HPLC , Spectrophotometry.

* Corresponding author E-mail address: info@nftif.org