

Ocena jakości szafranu (*Crocus sativus* L.) z wykorzystaniem metod spektroskopowych

Quality assessment of saffron (*Crocus sativus* L.) with the use of spectroscopic methods

Karolina Stolarek¹, Angelika Uram-Dudek², Iwona Wawer²,
Katarzyna Paradowska³

¹ Koło Naukowe „Free Radicals” przy Zakładzie Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, WUM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa,

² Karpacka Państwowa Uczelnia w Krośnie, ul. Dmochowskiego 12, 38-400 Krosno, e-mail: iwona.wawer@kpu.krosno.pl,

³ Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, WUM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: katarzyna.paradowska@wum.edu.pl

Słowa kluczowe: szafran, *Crocus sativus*, NMR, UV-Vis, właściwości antyoksydacyjne (DPPH), krocyna, safranal

Key words: saffron, *Crocus sativus*, NMR, UV-Vis, antioxidant properties (DPPH), crocin, safranal

Streszczenie

Szafran (*Crocus sativus* L.) to wyjątkowa roślina, ceniona na całym świecie. Uznawana za jedną z najdroższych i najszlachetniejszych przypraw. Właściwości szafranu znali już starożytni, którzy nie tylko dodawali szafran do dań i napitków, barwili nim tkaniny, ale także stosowali go w celach prozdrowotnych. Roślina ta jest doskonałym środkiem wspomagającym trawienie, poprawiającym nastrój i apetyt. W wielu badaniach naukowych wykazano również jej właściwości antydepresyjne, przeciwdrgawkowe, przeciwnowotworowe, antybakteryjne oraz antyoksydacyjne. Ze względu na szerokie zastosowanie tego materiału roślinnego, różne pochodzenie czy czas przechowywania, ważna jest weryfikacja surowca pod względem składu oraz właściwości. Stąd też ważne jest poszukiwanie szybkich, nieniszczących metod analitycznych, pozwalających na kontrolę surowca. W artykule przedstawiono analizę jakościową głównych bioaktywnych związków szafranu: krocyny, pikrokrocyny oraz safranalu z wykorzystaniem trzech technik spektroskopowych: spektroskopii UV-Vis, magnetycznego rezonansu jądrowego w stanie stałym (¹H MAS i ¹³C CPMAS NMR) oraz paramagnetycznego rezonansu jądrowego (EPR). Materiał poddano również analizie właściwości antyoksydacyjnych szafranu z wykorzystaniem testu zmiatania wolnego rodnika DPPH. Test przeprowadzono na materiale świeżym i pookresie starzenia materiału –

(promieniowanie UV). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że do przeprowadzenia analizy jakościowej badanych próbek wskazane jest zastosowanie kilku metod analitycznych w celu uzyskania pełnego obrazu. Widma ^1H MAS NMR zarejestrowane dla próbek w postaci proszku rozróżniają próbki na podstawie związków z mobilnymi łańcuchami alifatycznymi. Natomiast analiza widm ^{13}C CPMAS NMR umożliwia odróżnienie próbek i identyfikację głównych składników (pierścienie aromatyczne, cukry czy grupy karbonylowe). Wykorzystanie charakterystycznych pasm absorpcji dla głównych składników szafranu może stanowić podstawę do określenia jakości badanego materiału roślinnego. Przeprowadzona analiza z zastosowaniem rodnika DPPH wykazała, iż szafran posiada wysokie właściwości antyoksydacyjne, działanie promieni UV powoduje ich zmniejszenie średnio o 50%.

Summary

Saffron (*Crocus sativus*) is a unique plant, valued all over the world. Considered one of the most expensive and noble spices. The properties of saffron were already known to the ancients, who not only added saffron to dishes and drinks, dyed fabrics with it, but also used it for health-promoting purposes. This plant is an excellent digestive aid, improving mood and appetite. Many scientific studies have also demonstrated its antidepressant, anticonvulsant, anticancer, antibacterial and antioxidant properties. Due to the wide application of this plant material, different origin, or storage time, it is important to verify the raw material in terms of its composition and properties. Hence the search for fast, non-destructive analytical methods that allow for raw material control. The article presents a qualitative analysis of the main bioactive compounds of saffron: crocin, picrocrocin and safranal using three spectroscopic techniques: UV-Vis spectroscopy, solid state nuclear magnetic resonance (^1H MAS and ^{13}C CPMAS NMR) and nuclear paramagnetic resonance (EPR). The material was also analyzed for the antioxidant properties of saffron using the DPPH free radical scavenging test. The test was carried out on fresh material and after the material's aging period – (UV radiation). Based on the obtained results, it was found that for the qualitative analysis of the tested samples it is advisable to use several analytical methods to obtain a complete picture. The ^1H MAS NMR spectra recorded for the powder samples distinguished the samples based on compounds with mobile aliphatic chains. On the other hand, the analysis of ^{13}C CPMAS NMR spectra enables the differentiation of samples and the identification of the main components (aromatic rings, sugars, or carbonyl groups). The use of characteristic absorption bands for the main components of saffron can be the basis for determining the quality of the tested plant material. The analysis carried out with the use of the DPPH radical showed that saffron has high antioxidant properties, the effect of UV radiation reduces them by an average of 50%.

Wstęp

Za ojczyznę szafranu uważana jest Azja Mniejsza, a słowo szafran pochodzi od arabsko-perskiego *al-zafaron* i oznacza „żółty”, ale i „nitka” [4]. *Crocus sativus* – szafran uprawny to roślina jednoliścienna z rodziny kosaćcowatych (*Iridaceae*). Nie spotyka się szafranu w stanie dzikim, a miejsca upraw to głównie rejon Morza Śródziemnego, Hiszpania, Iran, Maroko, Grecja, Turcja, Francja oraz Kaszmir. Szafran to cenna przyprawa znana jako „czerwone złoto”, pozyskiwana z wysuszonych znamion słupka o ciemnopomarańczowej barwie [5], zbieranych ręcznie. Do dzisiaj szafran uważany jest za jeden z najdroższych surowców roślinnych, z tego też względu roślina ta od zawsze była i nadal jest powodem licznych oszustw i falsyfikacji, głównie z użyciem pomarańczowo-żółtych płatków aksamitki, nagietka czy krokosza barwierskiego [6, 7]. Słupki *Crocus sativus* zawierają trzy główne składniki: pikrokrocynę (odpowiedzialną za charakterystyczną goryczkę), safranal (nadający aromat) oraz krocynę (główny barwnik rozpuszczalny w wodzie). W szafranie zidentyfikowano również witaminy z grupy B: tiaminę (B1) i ryboflawinę (B2), olejki eteryczne w ilości od 0,3-1,5%. Pikrokrocyna i safranal stanowią łącznie do 4% szafranu, uważa się, że im większa jest ich zawartość tym lepsza jakość szafranu. Aktywne składniki szafranu są produktami metabolizmu złożonych karotenoidów, głównie zeaksantyny oraz w mniejszym stopniu likopenu [3, 8].

Szafran od samego początku funkcjonował jako symbol bogactwa i luksusu, a cena nie pozwalała na jego powszechne nabycie. Medyczne zastosowania szafranu obejmują leczenie zaparć, hamowanie zapalenia błony śluzowej, łagodzenie depresji, łagodzenie przekrwienia dróg oddechowych, zwiększenie apetytu, leczenie kaszlu, stymulator przepływu menstruacyjnego, wzmaganie laktacji i łagodzenie skurczów [9, 10]. W medycynie ludowej stosowany był jako lek uspokajający, przeciwskurczowy czy pobudzający apetyt. W postaci wyciągu obniża ciśnienie krwi oraz poziom cholesterolu. Wykazano także jego działanie antybakteryjne, antydepresyjne oraz antykancerogenne [11, 12, 13]. Szafran był wykorzystywany do regulowania miesiączkowania i jako afrodyzjak. Miał mieć również korzystny wpływ na dolegliwości żołądkowe. Stosowano go do leczenia ran [14]. W latach 90. XX wieku część z tych tradycyjnych wskazań stała się przedmiotem badań klinicznych i przedklinicznych, których wyniki potwierdzają przeciwzapalne, przeciwdepresyjne, antyoksydacyjne, immunomodulujące oraz cytostatyczne działanie składników szafranu [7, 8, 15, 16, 17, 18, 19].

Badania kliniczne efektu przeciwdepresyjnego szafranu zapoczątkował dziesięć lat temu profesor Shahin Akhondzadeh z Uniwersytetu Medycznego w Teheranie. Wpisywały się one w szerszy projekt, polegający na testowaniu efektów tradycyjnych leków roślinnych w psychiatrii, przy zastosowaniu metody naukowej [19, 20].

Szafran, głównie ze względu na zdolność nadawania potrawom zapachu, smaku oraz koloru, ma zastosowanie w kuchni. Jego intensywny smak (który określany jest jako korzenny, gorzki, lekko ostry, piżmowy) oraz kolor sprawiają, że przyprawa ta może być używana do przygotowania: makaronów, napojów (alkoholowych czy bezalkoholowych), mięs, ryb, deserów i ciast.

W artykule przedstawiono analizę jakościową głównych bioaktywnych związków szafranu: krocyny, pikrokrocyny oraz safranal z wykorzystaniem spektroskopii UV-Vis, magnetycznego rezonansu jądrowego w stanie stałym oraz paramagnetycznego rezonansu jądrowego.

W poszukiwaniu różnic w analizowanym materiale oznaczono również właściwości antyoksydacyjne szafranu (w porównaniu do innych przypraw) z wykorzystaniem testu zmiatania wolnego rodnika DPPH. Test przeprowadzono zarówno na materiale świeżo otwartym, jak i po 61 dniach starzenia materiału – poddanie działaniu promieni słonecznych.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiło 6 próbek przypraw z różnych źródeł oraz 4 wzorce (główne składniki szafranu: krocyna i safranal oraz kurkumina i β -karoten) zakupione w Sigma-Aldrich. Szczegółowy ich opis przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Zestaw badanych próbek, opis cech charakterystycznych.

Table 1. Set of test samples, description of characteristic features.

Nr próbki	Nazwa/Producent/Pochodzenie	Kolor materiału	Postać
1	Szafran – zakupiony w Tunezji (targ)	Pomarańczowy	Nitki
2	Kurkumina – zakupiona w Tunezji (targ)	Żółty	Proszek
3	Szafran – KAMIS	Czerwony	Nitki
4	Szafran – KOTANYI – s.10912211622	Czerwony	Nitki
5	Szafran – KOTANYI – s.10911101825	Czerwony	Nitki
6	Papryka chili – ze zbioru przypraw gospodarstwa domowego	Czerwony	Proszek
7	Krocyna – zakupiona w Sigma-Aldrich	Pomarańczowy	Proszek
8	Safranal – zakupiony w Sigma-Aldrich	Żółty	Ciecz
9	α -karoten – zakupiony w Sigma-Aldrich	Pomarańczowy	Proszek
10	Kurkumina – zakupiona w Sigma-Aldrich	Żółty	Proszek

Oznaczenie zdolności neutralizacji wolnych rodników z użyciem DPPH

Wśród wielu metod służących do oznaczania aktywności przeciwutleniającej, zarówno czystych związków chemicznych, jak i ekstraktów roślinnych czy suplementów diety są metody oparte na prostych reakcjach chemicznych między przeciwutleniaczem a modelowymi wolnymi rodnikami. Klasycznym przykładem takiego rodnika długo żyjącego jest 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH). Najczęściej stosuje się alkoholowe roztwory DPPH. Trwałość zapewnia mu delokalizacja pojedynczego elektronu występującego pomiędzy dwoma atomami azotu. Reakcja DPPH z antyoksydantem, może przebiegać na dwa sposoby. Może to być poprzez bezpośrednie przyłączenie kationu wodoru pochodzącego od antyoksydantu (są to najczęściej związki o charakterze fenoli) oraz poprzez przeniesienie elektronu na cząsteczkę DPPH, a w kolejnym kroku dołączenie atomu wodoru [21, 22]. Doświadczenia mające na celu ustalenie zdolności antyoksydacyjnej szafranu wykonano za pomocą aparatu MiniScope MS 200 i oprogramowania komputerowego rejestrującego i ułatwiającego opracowanie widma próbek.

Analizę wykonano dla dwóch serii próbek. Jedna seria (A) dotyczyła badania próbek przypraw szafranu pobranego bezpośrednio z opakowania, druga seria (B) dotyczyła tych samych próbek, ale poddanych działaniu promieni słonecznych przez okres dwóch miesięcy (61 dni). Poddanie próbek starzeniu pod wpływem promieni UV miało na celu określenie wpływu tych promieni UV – po pierwsze na zdolności antyoksydacyjne szafranu, a ponadto na sposób przechowywania przypraw. Wszystkie dalsze czynności były identyczne dla obydwu serii.

Nitki szafranu poddane zostały homogenizacji. Następnie zarówno tak rozdrobniony materiał, jak i ten będący w postaci proszku wyjściowo, odważono w dwóch seriach: ok. 25 mg (seria A) i 5 mg (seria B). Rozpuszczalnik zastosowany to metanol, w przypadku serii A dodano 5 mL, a do naważek z serii B po 1 mL. Tak sporządzone zawiesiny zostały poddane działaniu ultradźwięków (czas 15 minut, temperatura pokojowa). Po tym czasie ekstrakty przesączono i poddawano analizie z roztworu metanolowego rodnika DPPH (o stężeniu 1,288 mM).

Metanolowe przesącze próbek szafranu zmieszano w proporcji 1:1 z metanolem roztworem DPPH i inkubowano w temperaturze 37°C przez 90 minut. Po tym czasie rejestrowano widma na spektrometrze EPR. Wyniki były odnoszone do wzorca powstałego przez zmieszanie roztworu DPPH z metanolem w proporcji 1:1.

W celu określenia czasu zakończenia reakcji prowadzone były pomiary co kilka minut w czasie trwania reakcji. Po zakończonym eksperymencie wyniki zostały przeliczone na ilość DPPH zmiecionego przez 1 g szafranu (przyprawy).

Analiza jakościowa z zastosowaniem spektroskopii UV-Vis

Widma UV-Vis zostały wykonane przy użyciu spektrofotometru firmy Thermo Scientific Genesys 150 UV-VIS w Zakładzie Zielarstwa Karpackiej Państwowej Uczelni w Krośnie. Odważono ok. 1 g uprzednio zhomogenizowanych próbek szafranu (nitki), następnie rozpuszczono w 10 mL rozpuszczalnika, którym był etanol. Tak sporządzone zawiesiny zostały poddane działaniu ultradźwięków (czas 15 minut, temperatura pokojowa). Ekstrakty przesączono i odpowiednio rozcieńczono. Następnie rejestrowano widma UV-Vis z zastosowaniem kuwet kwarcowych.

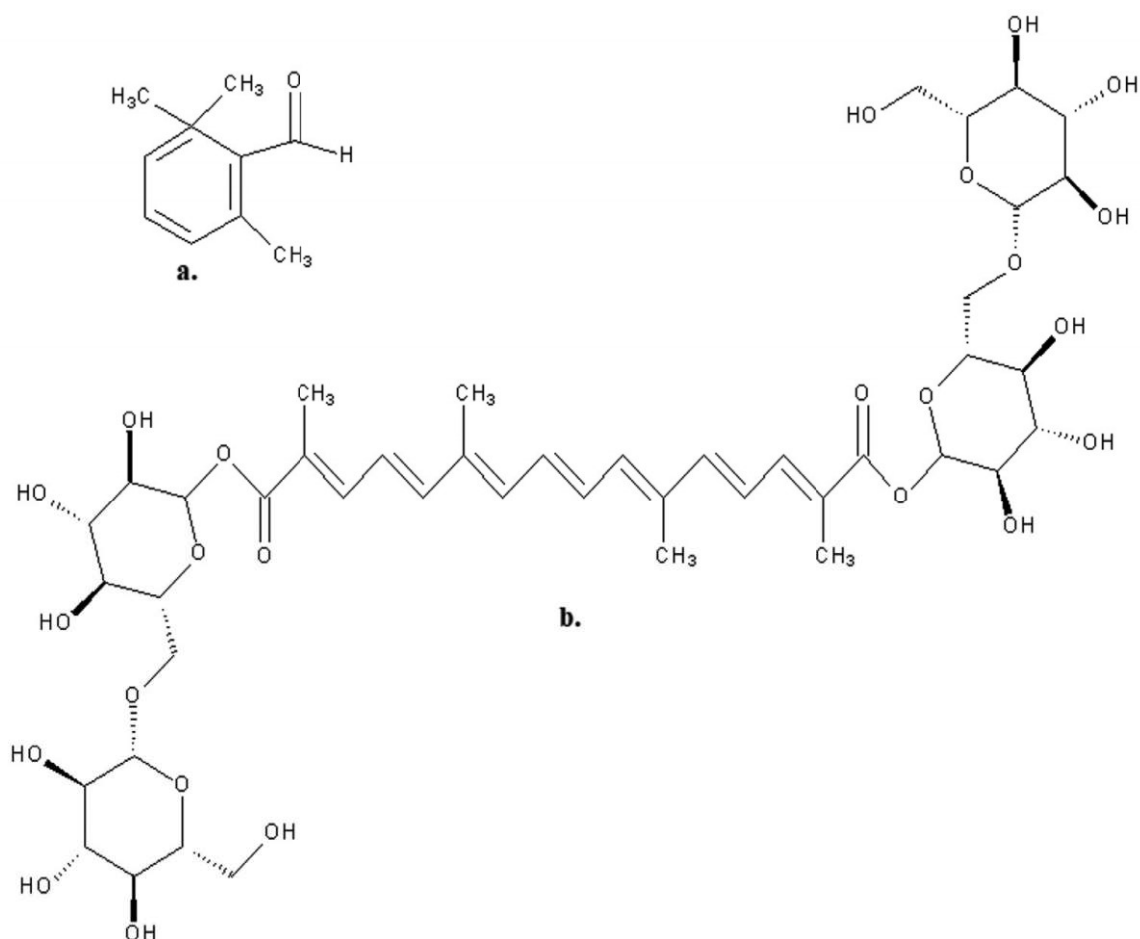
Analiza jakościowa z zastosowaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Widma ^1H MAS i ^{13}C CPMAS NMR zostały wykonane przy użyciu spektrometru firmy Bruker Avance DSX 400 MHz na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badana substancja umieszczana była w rotorze z tlenku cyrkonu (ZrO_2) i wirowana pod kątem magicznym z szybkością 10 kHz (^{13}C) i 35 kHz (^1H). Parametry akwizycji dobrane były pod względem potrzeb eksperymentu.

Wyniki i dyskusja

Na spektroskopię składa się duża grupa metod analitycznych, umożliwiających uzyskanie szeregu informacji na temat danego związku. W zależności od tego, jaki typ postępowania zostanie zastosowany, uzyskuje się odmienne właściwości substancji. Spektroskopia zajmuje się analizą widm powstających w wyniku oddziaływania elektromagnetycznego promieniowania z materią. Jest to zjawisko selektywnej absorpcji promieniowania przez badaną próbkę. Ze względu na rodzaj użytego promieniowania wyróżniamy spektroskopię UV, VIS, IR i NMR. W spektroskopii UV-Vis mamy – podczas oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią – przeniesienie elektronów na wyższe poziomy energetyczne (UV-VIS), a przypadku NMR zmianę orientacji spinów jądrowych. Spektroskopia UV-Vis to najbardziej popularna metoda analityczna w badaniach zarówno jakościowych, jak i ilościowych. Technika pomiarów w zakresie UV/Vis jest prosta, a aparatura łatwo dostępna. W przypadku analizy układów złożonych należy wziąć pod uwagę możliwość nakładania się pasm absorpcyjnych. W analizowanym materiale trzy substancje uważa się za kluczowe. Są to safranal (Rysunek 1a), krocyna (Rysunek 1b) oraz glikozyd pikrokrocyny (z którego podczas suszenia w wyniku rozpadu powstaje safranal).

Spektroskopia UV-Vis jest od dawna wykorzystywana w analizie związków chemicznych. Obejmuje zakres nadfioletu – UV (200-380 nm) oraz promieniowanie widzialne – Vis (380-780 nm). Absorpcja promieniowania powoduje przeniesienie elektronu z orbitalu niższego na wyższy, a tym samym jego wzbudzenie.

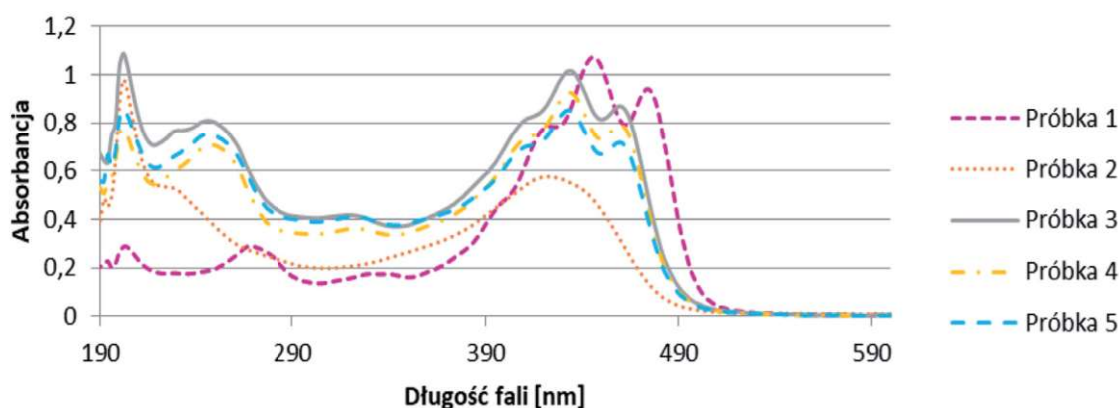


Rysunek 1. Wzory strukturalne głównych składników szafranu: a. safranal, b. krocyn.

Figure 1. Structural formulas of the main components of saffron: a. safranal, b. crocin.

Porównanie widm analizowanych próbek 1-5 wskazuje, że szafran (*Crocus sativus* L.) (proszek i nitki) zawierają prawie te same lub bardzo podobne cząsteczki, jednakże w różnym stężeniu.

WIDMA UV-Vis

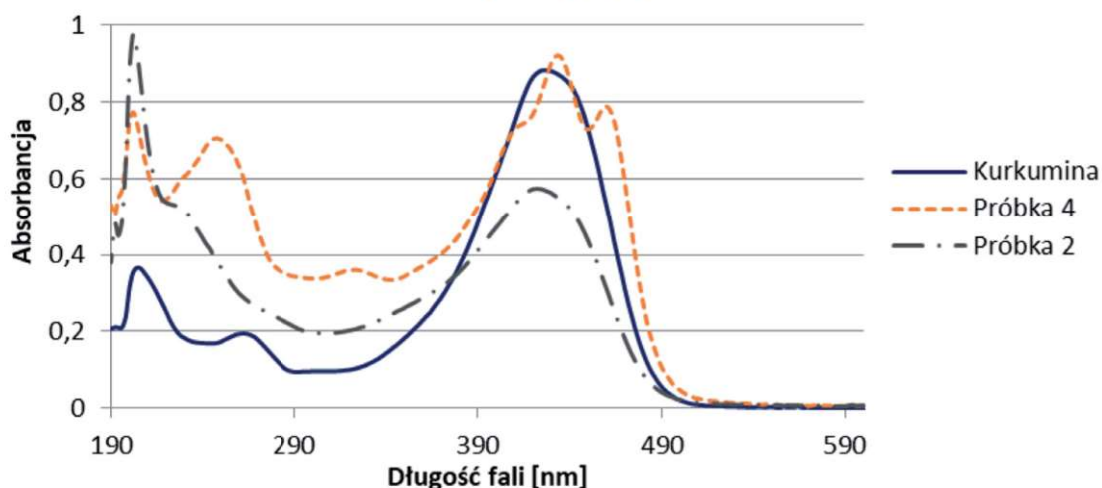


Rysunek 2. Widma UV-Vis dla analizowanych 5 próbek.

Figure 2. UV-Vis spectra for 5 analyzed samples.

Cztery z pięciu widm w swoim kształcie są jednakowe, szczególnie w zakresie 400-450 nm (Rysunek 2). W tym zakresie swoje maksimum wykazuje krocyna (szerokie pasmo przy 440 nm jest determinantem jej obecności) [23]. Natomiast próbka nr 2 (według oznaczeń jest to kurkumina) wykazuje odmienny kształt, choć maksima występują w zbliżonym zakresie (Rysunek 3).

WIDMA UV-Vis



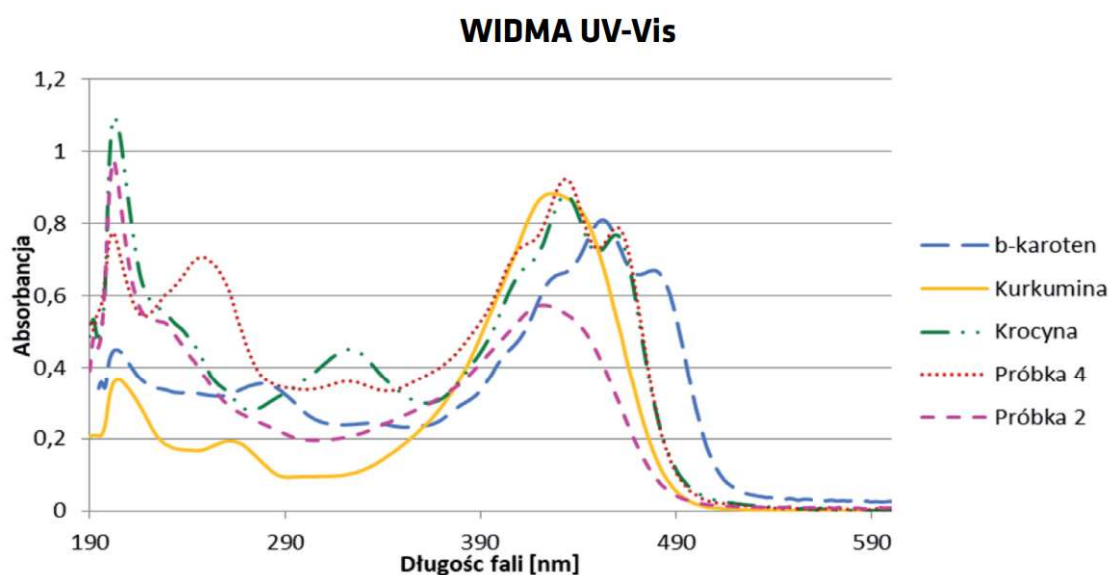
Rysunek 3. Zestaw widm UV-Vis dwóch analizowanych próbek (2 i 4) vs kurkumina.

Figure 3. Set of UV-Vis spectra of two analyzed samples (2 and 4) vs curcumin.

To, że próbkę nr 2 stanowi próbka kurkuminy potwierdza zestawienie na Rysunku 3 próbek 2 i 4 oraz dodatkowo kurkuminy.

Próbki 1, 3, 4 i 5 wykazują – oprócz maksimum przy 440 nm – również charakterystyczne maksimum absorpcji dla pikrokrocyny, wynoszące 254 nm [24] i maksimum przy 330 nm, wskazujące na obecność safranalu [25]. Intensywność tego pasma jest niewielka, stąd wniosek, że ilościowo tego związku jest najmniej.

Kształt widma przy 440 nm jest zbliżony do pasma charakterystycznego dla β -karotenu. W celu wyeliminowania tej substancji zarejestrowano widmo dla czystej substancji i z porównania widać delikatne różnice w kształcie (Rysunek 4).



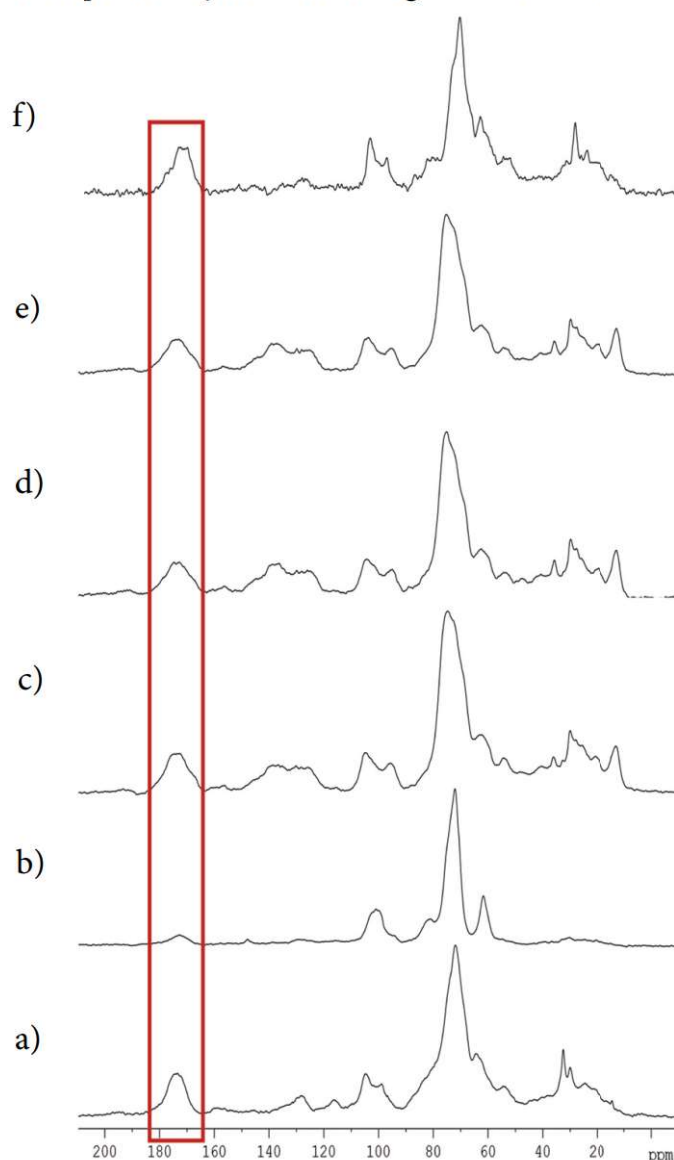
Rysunek 4. Widma UV-Vis dla trzech wzorców vs dwie próbki (nr 2 i 4).

Figure 4. UV-Vis spectra for three standards vs two samples (no. 2 and 4).

Znaczących informacji o jakościowym składzie mogą również dostarczyć zarejestrowane dla poszczególnych próbek widma NMR, zarówno ^1H MAS, jak i ^{13}C CPMAS NMR. Na ich podstawie można określić obecność poszczególnych składników mieszaniny (główne składniki), a także stwierdzić jakość materiału, czyli czy próbka przyprawy szafranu jest czysta, czy też może została zafałszowana jakąś inną substancją. Techniki stanu stałego są wykorzystywane do charakteryzowania substancji stałych: substancji aktywnych i ich postaci dawkowania (tabletek/kapsułek), a także ich wzajemnych oddziaływań. Widma ^{13}C CPMAS NMR były wykorzystywane do opisu wielu związków organicznych syntetycznych, takich jak biomolekuł wyizolowanych z roślin [26, 27, 28, 29], a także dla materiału amorficznego [30], jaki stanowią, np. przyprawy. Narzędzie to jest szczególnie przydatne, gdy mamy do czynienia z substancjami trudno rozpuszczalnymi, a także nietrwałymi w roztworze, ulegającymi rozkładowi lub polimeryzacji [31, 32]. Informacje strukturalne dotyczące, np. antybiotyków stałych, przeciwmalarycznych czy leków przeciwłękowych uzyskano na podstawie analizy widm ^{13}C CPMAS NMR. Często wykorzysty-

wanym obszarem badawczym jest polimorfizm. Polimorfy mogą wykazywać różną rozpuszczalność oraz biodostępność. NMR w stanie stałym ma zdolność do różnicowania takich związków. Technika MAS NMR idealnie nadaje się do identyfikacji substancji czynnej w tabletkach czy do badań interakcji leków z wypełniaczami. Zaletą techniki jest też jej niedestrukcyjny charakter; próbka wyjęta z rotora może być dalej wykorzystana do analizy z zastosowaniem innych technik analitycznych, np. NMR w roztworze lub chromatografii [33].

W widmach ^{13}C CPMAS NMR wszystkich analizowanych próbek istnieje wyraźny sygnał o wartości przesunięcia chemicznego $\delta = 172,63\text{-}174,84$ ppm (Rysunek 5).



Rysunek 5. Standardowe widma ^{13}C CPMAS NMR dla 6 próbek. Kolejno próbka nr 1 (a), próbka nr 2 (b), próbka nr 3 (c), próbka nr 4 (d), próbka nr 5 (e), próbka nr 6 (f).

Figure 5. Standard ^{13}C CPMAS NMR spectra for 6 samples. Sequentially, sample 1 (a), sample 2 (b), sample 3 (c), sample 4 (d), sample 5 (e), sample 6 (f).

Uważa się, że głównymi składnikami szafranu są dwie substancje: safranal i krocyna (Rysunek 1). Krocyna (o wzorze sumarycznym $C_{44}H_{64}O_{24}$) to organiczny związek z grupy karotenoidów, odpowiedzialna przede wszystkim za kolor szafranu, natomiast safranal ($C_{10}H_{14}O$), odpowiedzialny za aromat, to produkt degradacji karotenoidu zeaksantyny poprzez pośrednią pikrokrocynę. Zatem interesujące było, czy można dokonać szybkiej ich identyfikacji w cieple stałym z wykorzystaniem NMR.

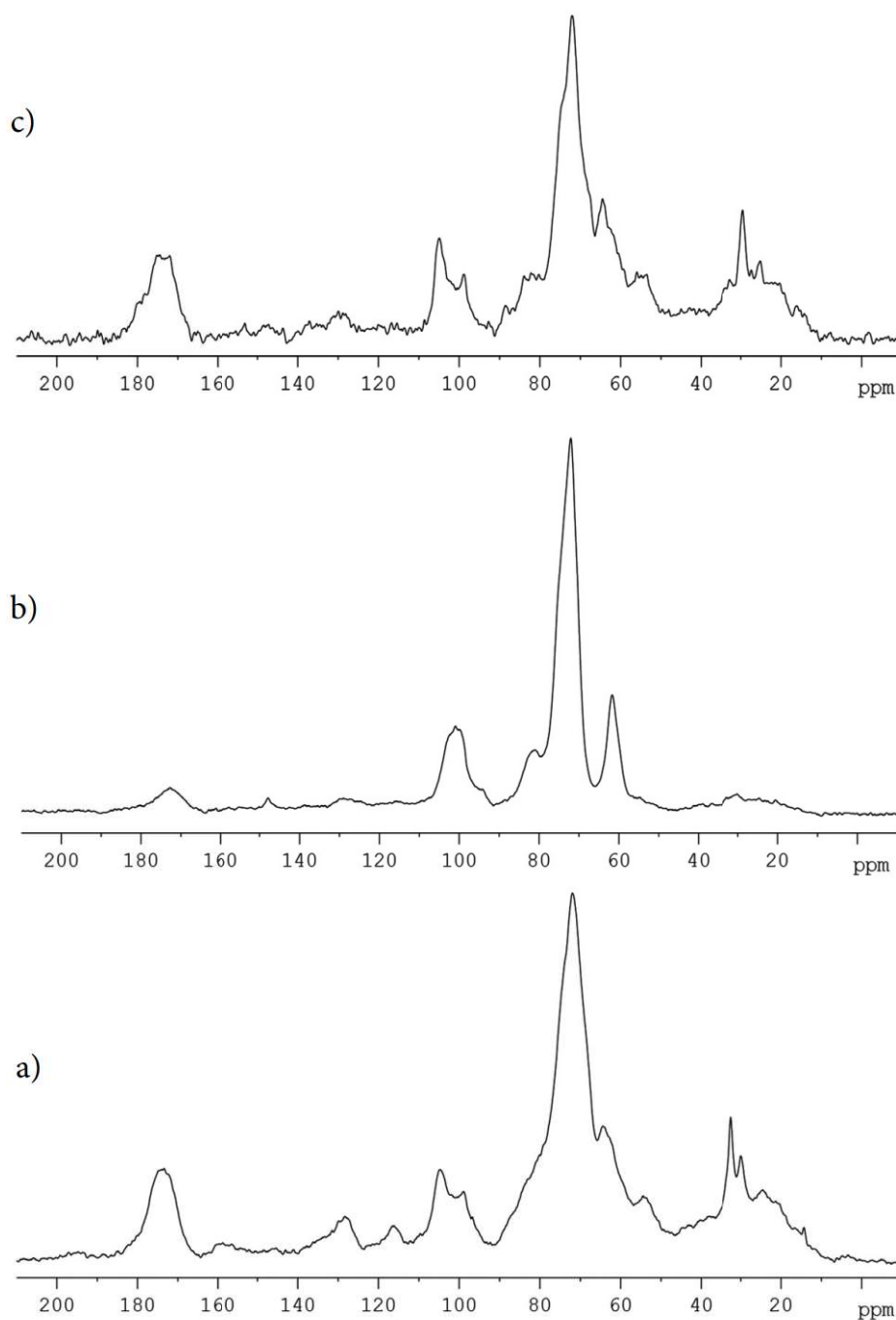
Ten zakres ppm jest charakterystyczny dla występowania grup C=O. W przypadku badanego materiału zarówno krocyna, jak i safranal zawierają C=O, choć w widmie roztworu safranalu sygnał dla tego węgla występuje w okolicach 190 ppm. W widmach w cieple stałym sygnał pochodzący od aldehydowej grupy safranalu jest przesunięty na skutek tworzenia się wiązania wodorowego z udziałem grupy C=O. Dla próbki 2 da się zauważyć, iż sygnał grupy C=O ma mniejszą intensywność (Rysunek 5b) niż sygnał ten w widmach pozostałych próbek. Widmo ^{13}C CPMAS NMR dla próbki 2 jest wyróżniające się na tle innych zarejestrowanych widm. Widma próbek 3-5 są niemalże identyczne co do ilości sygnałów i ich kształtu. Grupa sygnałów w okolicach 125-140 ppm charakterystyczna jest dla węgla czwartorzędowych, które obecne są zarówno w cząsteczce safranalu, jak i krocyny. W widmie próbek 2 i 6 (Rysunek 5b i f) w tym zakresie nie widać żadnych wyraźnych sygnałów, natomiast w widmie próbki 1 mamy nieco inny kształt tych sygnałów i są przesunięte, mają niższą wartość przesunięcia chemicznego (Rysunek 6). Może to być wynik większej wilgotności próbki; w takim środowisku mogły zachodzić reakcje przemiany krocyny w pikrokrocynę lub nawet częściowy jej rozkład, w wyniku czego grupy węgla z wiązaniem podwójnym występują w mniejszej ilości lub są inaczej połączone.

Ważnym interpretacyjnie zakresem jest zakres odpowiadający cukrom i występuje on od 105 do 54 ppm. We wszystkich widmach wygląda podobnie, jednakże w widmach próbek 2 i 6 wyróżniają się intensywnymi sygnałami (Rysunek 6.) Te niewielkie różnice mogą być spowodowane występowaniem innych cukrów albo innymi ich połączeniami. Widmo krocyny w zakresie typowym dla cukrów jest podobne do widma próbek o numerach 1, 3, 4 i 5, ale nie można wykluczyć obecności innego związku zawierającego cukry, np. pikrokrocyny. Charakterystyczne przesunięcia chemiczne świadczą o tym, że krocyna jest obecna w badanych próbkach (oprócz nr 2 i 6).

W widmie węglowym charakterystyczny jest jeszcze trzeci zakres, zakres alifatyczny. W widmach szafranu występują sygnały w zakresie 36-12 ppm, które odpowiadają grupom CH_3 . Grupy te są obecne zarówno w cząsteczce safranalu, jak i krocyny. Przesunięcia chemiczne są podobne dla próbek 3-5, różnią się dla próbek 1 i 6, a próbka 2 nie posiada w tym zakresie żadnych sygnałów (Rysunek 6). Interpretując widmo, zauważamy, że w próbkach 1 i 6 mogą istnieć inne związki, a krocyna jest prawdopodobnie w mniejszej ilości. Przemawia za tym fakt, iż w widmie

Ocena jakości szafranu (*Crocus sativus* L.) z wykorzystaniem...

krocyny najbardziej wyraźny jest sygnał przy 13,3 ppm, natomiast w próbce 1 i 6 jest on niski. Grupa intensywnych sygnałów powstała prawdopodobnie z nałożenia widm krocyny i safranalu, ponieważ safranalu w tym zakresie posiada bardzo silne rezonanse. Próbką 6 to papryka w proszku, zawiera prawdopodobnie pochodną krocyny lub inny karotenoid.

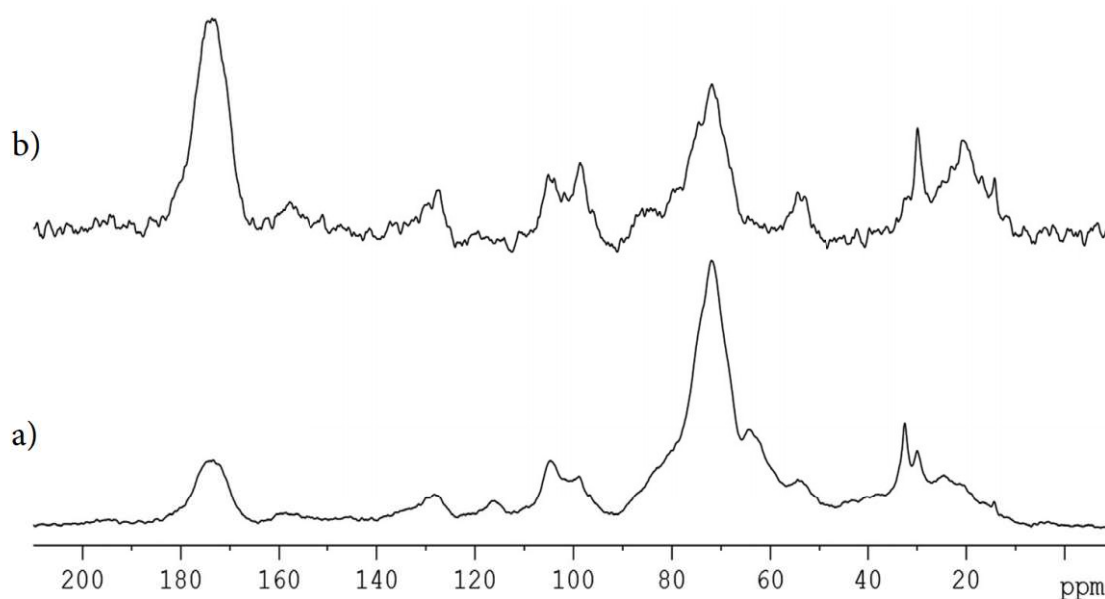


Rysunek 6. ^{13}C CPMAS NMR próbki nr 1 (a), próbki nr 2 (b) i próbki nr 6 (c).

Figure 6. ^{13}C CPMAS NMR of sample 1 (a), sample 2 (b) and sample 6 (c).

Podsumowując, metoda NMR pozwala na ustalenie, czy w danej próbce znajduje się szafran, czy inna substancja. Kurkumina oraz papryka mają zupełnie inne widma, brak charakterystycznych dla szafranu sygnałów. Na podstawie porównania widm możemy określić, czy próbka zawiera szafran. Mając do porównania przesunięcia chemiczne czystej krocyny oraz pikrokrocyny [34, 35] można określić, czy w próbce dominuje krocyna, czy już zdążyła rozłożyć się z utworzeniem pikrokrocyny. Można więc stwierdzić, że jakość szafranu jest możliwa do ustalenia poprzez analizę widm NMR. Jak wiadomo szafran o wysokiej jakości powinien być bogaty w krocynę.

Zarejestrowanie widma z „dipolar dephase” (DD) pozwoliło na redukcję sygnałów pochodzących od węgla cukrowych ($-CH$), a wzmocnienie sygnałów pochodzących od węgla czwartorzędowych w zakresie aromatycznym widma. W widmie DD próbki 1 widać, że sygnały cukrowe są niższe, a w zakresie 140-125 ppm pojawiają się nowe sygnały, oprócz tych przy 138,5 i 130,1 ppm mamy również rezonanse przy 128,3 i 124,9 ppm (Rysunek 7).

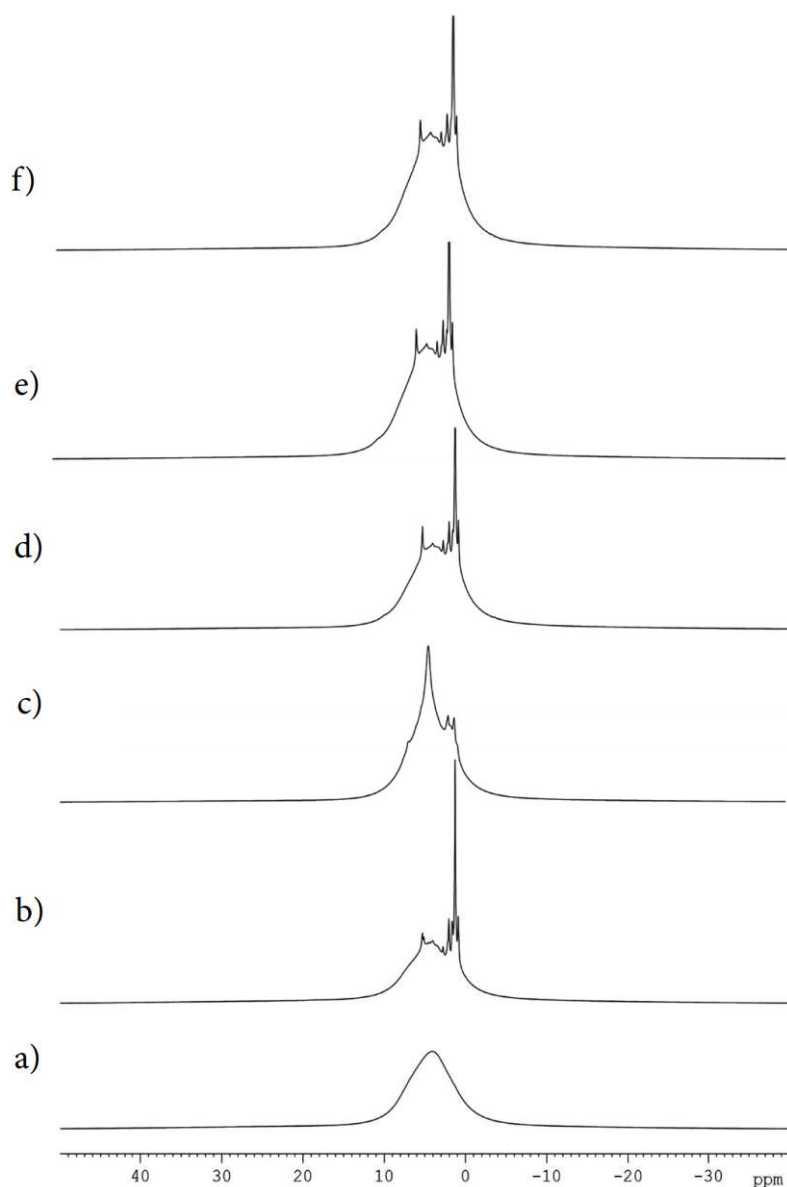


Rysunek 7. ^{13}C CPMAS NMR próbki nr 1 standard (a) oraz dipolar dephasing (b)

Figure 7. ^{13}C CPMAS NMR sample no.1 standard (a) and with dipolar dephasing (b)

Widma 1H MAS NMR nie dają informacji strukturalnych, ponieważ wirowanie próbki z szybkością 33 kHz nie uśrednia oddziaływań dipolowych. Widma 1H MAS NMR wszystkich analizowanych badanych próbek przedstawia Rysunek 5. Nawet widmo 1H MAS NMR dla czystego związku w fazie stałej, np. krocyny (Rysunek 8a), daje szeroki kontur w całym zakresie spektralnym dla protonu (0-10 ppm) z maksimum przy 4,5 ppm.

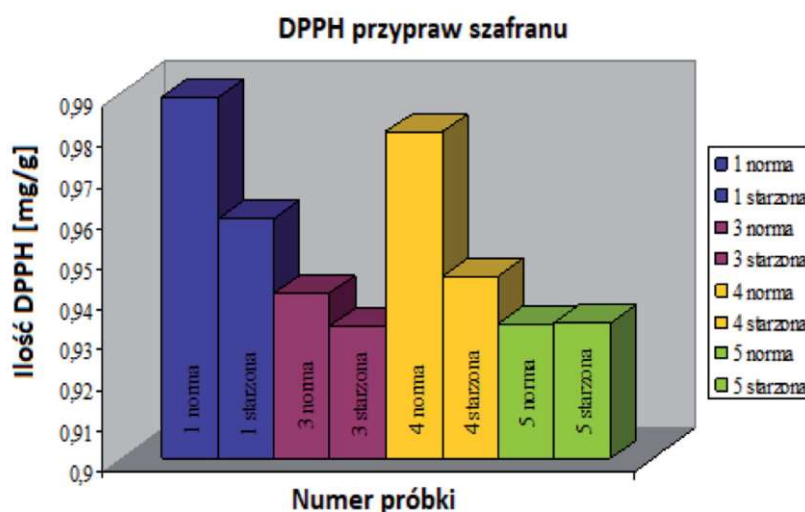
Widma poszczególnych próbek analizowanego materiału, który stanowi mieszanina związków w fazie stałej, są szczególnie trudne w interpretacji. Jednak mobilne grupy protonów dają charakterystyczne wąskie sygnały, które wyróżniają się na tle szerokiego konturu. Tego typu sygnały dają lipidy oraz alifatyczne łańcuchy grup metylenowych ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Profil takich związków widoczny w widmie jest charakterystyczny dla próbki/materiału (Rysunek 5) jak „odcisk palca” i można stwierdzić, czy dana próbka zawiera mobilne strukturalnie składniki, typowe dla szafranu, czy mamy do czynienia z autentykiem lub też zafałszowaną próbką.



Rysunek 8. ^1H MAS NMR dla 6 próbek: krociny (a), próbka nr 1 (b), próbka nr 2 (c), próbka nr 3 (d), próbka nr 4 (e) oraz próbka nr 5 (f).

Figure 8. ^1H MAS NMR for 6 samples: crocin (a), sample 1 (b), sample 2 (c), sample 3 (d), sample 4 (e) and sample 5 (f).

Przeprowadzona analiza właściwości antyoksydacyjnych próbek „świeżych” i po starzeniu promieniami UV, czyli dwóch serii (A i B) wykazała zróżnicowanie analizowanego materiału (Rysunek 9). Analizy można dokonać przy użyciu spektroskopii UV-VIS (pomiar przy długości fali 515 nm) bądź elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), która jest metodą często wykorzystywaną do badania aktywności antyoksydacyjnej związków chemicznych z udziałem rodników zarówno materiału w stanie stałym, ciekłym, ale również gazowym. Spektroskopia EPR wykrywa nawet stężenia rodników rzędu 10^{-9} [36].



Rysunek 9. Porównanie ilości wymiecionych wolnych rodników przez poszczególne próbki.

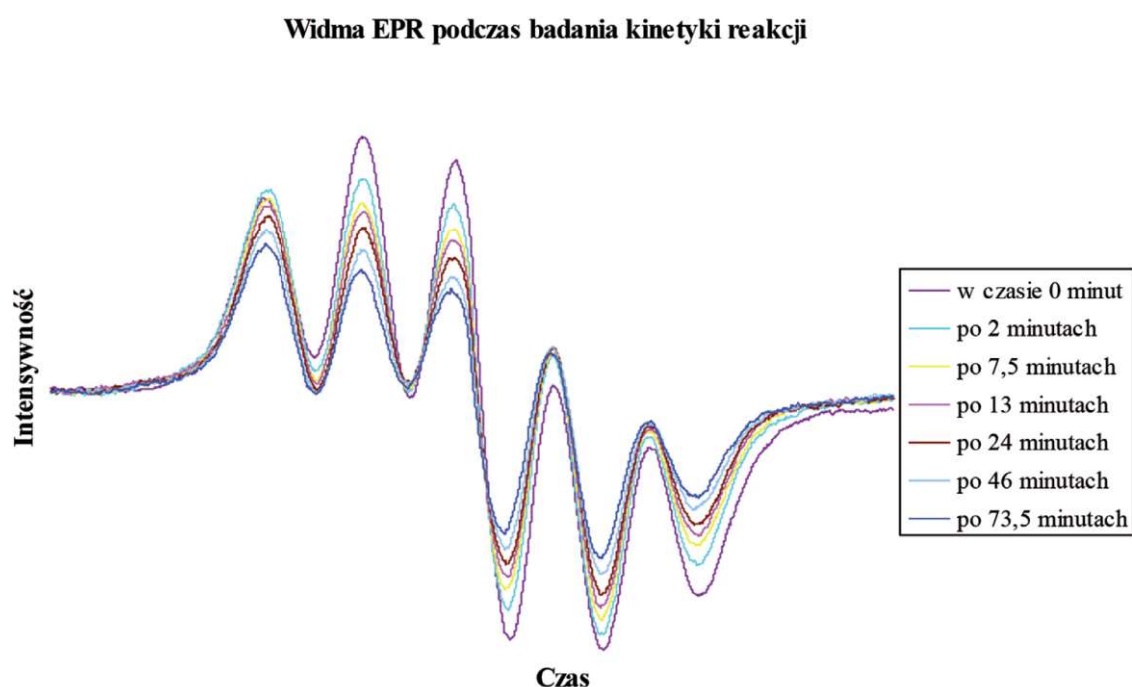
Figure 9. Comparison of the amount of free radicals swept away by individual samples.

Na rysunku przedstawiono wyniki ilości mg DPPH zneutralizowane przez 1g próbki szafranu (zgodnie z deklaracją producenta/sprzedającego) po zakupie materiału oraz po okresie 61 dni nasłonecznienia. Materiał można podzielić na dwie grupy o zbliżonych właściwościach antyoksydacyjnych. Próbki 1 i 4 wykazywały najwyższe właściwości antyoksydacyjne, natomiast wyniki próbek 3 i 5 były o połowę niższe. W przypadku próbek 1 i 5 zróżnicowanie może wynikać z pochodzenia przyprawy, natomiast w przypadku zaobserwowanych różnic próbek 4 i 5 jest to dość zaskakujące. Próbki pochodzą od jednego producenta, różnią się numerem serii, a zatem różni je czas wytworzenia (inny czas zapakowania). Być może torebki przypraw z innym numerem seryjnym pochodziły z różnych źródeł lub były w inny sposób suszone.

Dla każdej przebadanej, starzonej próbki zdolność antyoksydacyjna wyraźnie zmalała. Nie była to jednak wartość identyczna. Próbki 1 i 4 starzały się szybciej niż próbki 3 i 5. Nie mogła na to wpływać postać przyprawy (nitka lub proszek), gdyż wszystkie 4 przebadane próbki występowały wyjściowo w formie nitek. Czynnikiem

wpływającym na różne tempo starzenia najprawdopodobniej jest procent zawartości wody w badanych materiałach. Interesujące okazało się, że nawet w próbkach pochodzących od tego samego producenta (próbki 4 i 5) zdolność antyoksydacyjna starzonej próbki nie była taka sama. Próbka 5 praktycznie nie wykazała zmian we właściwościach antyoksydacyjnych po okresie starzenia w porównaniu do próbki wyjściowej.

Na Rysunku 10 przedstawiono przykładowe widma paramagnetycznego rezonansu elektronowego (EPR) zarejestrowane dla próbki szafranu 3 (według Tabeli 1). Są to widma rejestrowane w czasie po zmieszaniu ekstraktu próbki z metanolem w roztworze DPPH.



Rysunek 10. Wybrane widma próbki 3 szafranu zarejestrowane metodą EPR podczas badania kinetyki reakcji z DPPH.

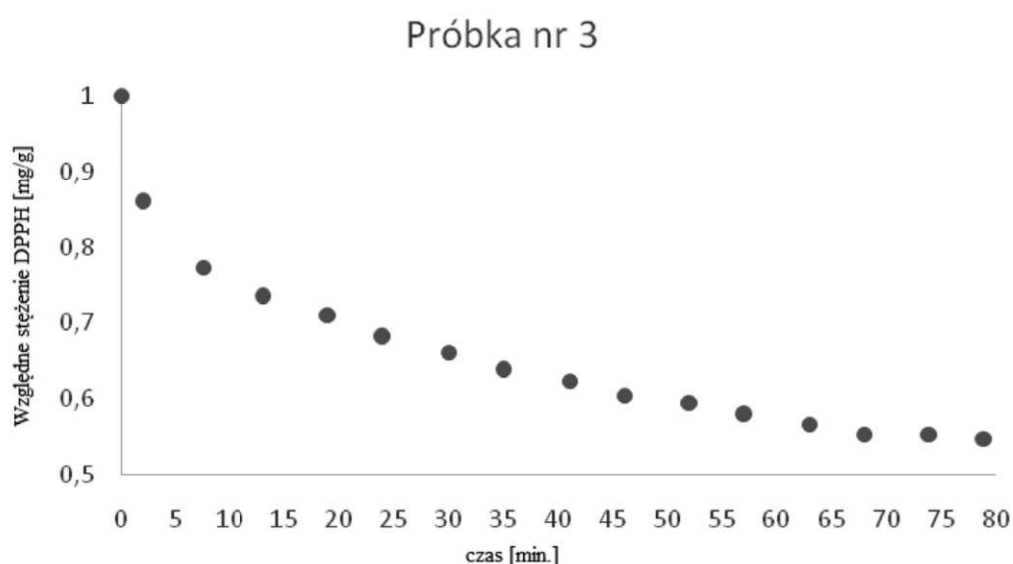
Figure 10. Selected spectra of sample 3 of saffron recorded using the EPR method during the kinetics of the reaction with DPPH.

Na podstawie przeprowadzonych serii pomiarów, czyli badania kinetyki reakcji neutralizacji DPPH, wyznaczone zostały względne stężenia DPPH, które zostały przedstawione w odniesieniu do wartości w czasie $t=0$ przyrównanej do 1 (Tabela 2).

Tabela 2. Kinetyka reakcji neutralizacji rodnika DPPH przez próbkę przyprawy szafranu (nr 3).**Table 2.** Kinetics of the DPPH radical neutralization reaction by a sample of saffron spice (no. 3).

Czas [min]	Względne stężenie DPPH [mg/g]	Czas [min]	Względne stężenie DPPH [mg/g]
0	1	41	0,623
2	0,859	46	0,605
7,5	0,773	52	0,595
13	0,734	57	0,579
19	0,710	63	0,567
24	0,681	68	0,554
30	0,661	74	0,554
35	0,638	79	0,548

Dzięki zestawieniu widm rejestrowanych w różnym czasie mamy możliwość zaobserwować, w jaki sposób zmienia się ilość rodnika DPPH w próbce. Pozwala to określić, jaka część DPPH (względne stężenie) przereagowała z antyoksydantami zawartymi w ekstraktach szafranu. Te wartości posłużyły do zbadania zależności stężenia DPPH od czasu reakcji (Rysunek 11). Czas reakcji neutralizacji pomiędzy rodnikiem a badanymi próbkami nie przekracza 75 minut. Szybkość reakcji widocznie spada w ciągu pierwszych 25 minut, następnie postęp reakcji zachodzi łagodniej, aż po ok. godzinie osiągnane jest *plateau*.

**Rysunek 11.** Przebieg kinetyki reakcji neutralizacji DPPH przez związki zawarte w próbce nr 3.**Figure 11.** The course of the kinetics of the DPPH neutralization reaction by the compounds in sample 3.

Badania prowadzone metodą EPR potwierdziły, że związki pochodzące z szafranu wykazują zdolność antyoksydacyjną.

Wnioski

W wielu przypadkach do analizy jakościowej jest wskazane zastosowanie kilku metod analitycznych w celu uzyskania pełnego obrazu. Często też zastosowanie NMR w fazie stałej w analizie substancji praktycznie nierozpuszczalnych albo, które ulegają rozkładowi w roztworze lub tworzą w nim zawiesiny, jest wręcz niezbędne. Widma ciał stałych rejestrowane analogicznymi jak w roztworze technikami znacznie się od nich różnią. Charakteryzują się szerokimi, niesymetrycznymi sygnałami, pozbawionymi zazwyczaj struktury subtelnej, co uniemożliwia analizę strukturalną związków. Otrzymywane w widmie szerokie linie są wynikiem kilku czynników. Najważniejsze z nich to silne dipolowe oddziaływania między jądrami, a także efekt anizotropii przesunięć chemicznych [37, 38]. W widmach rejestrowanych w roztworze szybkie ruchy molekuł uśredniają silne oddziaływania dipoli magnetycznych z zewnętrznym polem magnetycznym, natomiast w przypadku ciała stałego, ruchy te są zahamowane.

Widma ^1H MAS NMR zarejestrowane dla próbek w postaci proszku pozwalają odróżnić związki z mobilnymi łańcuchami alifatycznymi, a analiza widm ^{13}C CPMAS NMR umożliwia zarówno odróżnienie, próbek jak i identyfikacje głównych składników (pierścienie aromatyczne, cukry czy grupy karbonyłowe). Analiza z zastosowaniem NMR w ciele stałym potwierdza pochodzenie próbki i w nieinwazyjny sposób potwierdza autentyczność produktu (zgodność z deklaracją producenta). Spektroskopia NMR w stanie stałym jest ważną techniką w wielu obszarach, między innymi w dziedzinie nauk farmaceutycznych, kosmetycznych czy właśnie spożywczych.

Wykorzystanie charakterystycznych pasm absorpcji dla głównych składników szafranu może stanowić podstawę do określenia jakości badanego materiału roślinnego. Jednakże w obecności innych karotenoidów (maksimum 450 nm) może nie być w 100% miarodajny.

Pokazano także, że szafran posiada zdolności antyoksydacyjne. Związki zawarte w przyprawie neutralizują rodnik DPPH, co widać w widmach EPR monitorujących spadek stężenia DPPH względem wzorca. Reakcja z rodnikiem DPPH prowadzona w temperaturze 32°C po upływie 75 minut jest prawie zakończona, co pokazują pomiary kinetyczne. Zdolności wymiatania rodnika są różne dla każdej badanej próbki. Postępowanie przed zapakowaniem przyprawy oraz sposób przechowywania może mieć wpływ na jej skład i właściwości antyoksydacyjne.

Dla próbek szafranu zbadanych pod względem zdolności antyoksydacyjnej widoczne są wyraźne różnice. Nawet próbki 4 i 5 różnią się znacząco, mimo, że pochodzą od tego samego producenta. Przekonuje to, że w przypadku tak wrażliwego surowca jak szafran konieczne są badania jego jakości, a także sprawdzanie jego autentyczności.

Próbki wystawione na działanie promieni słonecznych przez okres dwóch miesięcy wykazują znacznie słabsze zdolności antyoksydacyjne w stosunku do tych przechowywanych prawidłowo. Niektóre jednak nie zmieniły w większym stopniu tych właściwości, na przykład próbka 5. Największe różnice obserwowano dla próbek 1 i 4, czyli dla surowca w postaci nitek.

Literatura

- [1] Łojewski M., Muszyńska B., Opoka W., Rojowski J., Sułkowska- Ziaja K., Surowce naturalne mające znaczenie w profilaktyce i wspomagające leczenie depresji, *Psychiatria Polska*, 2015, 49(3), s. 435-453.
- [2] Sztaba D., Znaczenie roślin biblijnych w farmacji, manuskrypt pracy magisterskiej, Katedra Farmakognozji Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, Kraków, 2007, s. 71-80, 153-156, 311-320, 354-360, 385-396.
- [3] Schmidt M., Betti G., Hensel A., Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses, *Wien Med Wochenschr*, 2007, 157(13-14), s. 315-319.
- [4] Harper D., Szafran, *Słownik etymologii online*, 2016.
- [5] Rocchi R., Mascini M., Sergi M., Compagnone D., Mastrocola D., Pittia P., Crocins pattern in saffron detected by UHPLC-MS/MS as marker of quality, process and traceability, *Food Chemistry*, 2018, 264, s. 241-249.
- [6] Koocheki A., Milani E., Saffron adulteration, *Saffron*, 2020, s. 321-334.
- [7] Tahir ul Gani M., Khurshid Wani A., Singh J., Shukla S., Therapeutic application and toxicity associated with *Crocus sativus* (saffron) and its phytochemicals, *Pharmacological Research – Modern Chinese Medicine*, 2022, 4, s. 100136-100147.
- [8] Ulbricht C., Seamon E., Windsor R.C., Armbruester N., Dawn Costa J.K., Giese N., Gruenwald J., Iovin R., Isaac R., Grimes Serrano J., Tanguay-Colucci S., Weissner W., Yoon H., Zhang J., An evidence-based systematic review of cinnamon (*Cinnamomum spp.*) by the Natural Standard Research Collaboration, *Journal of Dietary Supplements*, 2011, 8(4), s. 378-454.
- [9] Sharma M., Thakur R., Sharma M., Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Crocus sativus* (saffron), *Journal of Indian Botanical Society*, 2020, 99, s. 115-126.
- [10] Mohajeri S.A., Sepahi S., Azam A.G., Antidepressant and antianxiety properties of saffron, *Saffron*, 2020, s. 431-444.
- [11] Csupor D., Tóth B., Mottaghipisheh J., Zangara A., Al-Dujaili Emad A.S., The psychopharmacology of saffron, a plant with putative antidepressant and neuroprotective properties, [w:] *Nutraceuticals in Brain Health and Beyond*, red. Dilip Ghosh, Academic Press, London, 2021, s. 213-226.

- [12] Gohari A.R., Saeidnia S., Mahmoodabadi M.K., An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties, *Pharmacognosy Reviews*, 2013, 7, s. 61-66.
- [13] Escribano J., Alonso G.L., Fernandez J.A., Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus*) inhibit the growth of human cancer cells in vitro, *Cancer Letters*, 1996, 100(1-2), s. 23-30.
- [14] Hosseinzadeh H., Nassiri-Asl M., Avicenna's (Ibn Sina) the Canon of Medicine and Saffron (*Crocus sativus*): A Review, *Phytotherapy Research*, 2013, 4, s. 475-483.
- [15] Abdullaev I., Espinosa-Aguirre J.J., Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials, *Cancer Detection and Prevention*, 2008, 28(6), s. 426-432.
- [16] Jazani A.M., Karimi A., Azgomi R.N.D., The potential role of saffron (*Crocus Sativus* L.) and its components in oxidative stress in diabetes mellitus: A systematic review., *Clinical Nutrition ESPEN*, 2022, 48, s. 148-157.
- [17] Melnyk J.P., Wang S., Marccone M.F., Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron, *Food Research International*, 2010, 43(8), s. 1981-1989.
- [18] Karimi Gh., Hosseinzadeh H., Khaleghpanah P., Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice, *IJBMS*, 2001, 4, s. 11-15.
- [19] Noorbala A.A., Akhondzadeh S., Tahmacebi-Pour N., Jamshidi A.H., Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 97(2), s. 281-284.
- [20] Akhondzadeh S., Fallah-Pour H., Afkham K., Jamshidi A.H., Khalighi-Cigaroudi F.J., Comparison of *Crocus sativus* L. and Imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double blind randomised trial, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2007, 31(2), s. 439-442.
- [21] Cybul M., Nowak R., Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych, *Herba Polonica*, 2008, 54(1), s. 68-78.
- [22] Wilczyńska A., Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2009, XLII, 3, s. 870-874.
- [23] ISO/TS 3632-1/2. Technical Specification. *Crocus sativus* L. Saffron. Ed. ISO, Geneva, Switzerland, 2003.
- [24] Alonso G.L., Carmona M., Zalacain A., Gonzalez L.V., Gonzalez M.L., Sarasa-Delgado F., Study of saffron adulteration by increasing its coloring strength, [w:] *Proceedings of 1st International Congress PFT Pigments in Food Technology*, 1999, 24-26, s. 341-346.
- [25] Roedel W., Petrzika M., Analysis of the volatile components of saffron, *Journal of High Resolution Chromatography*, 1991, 14, s. 771-774.
- [26] Wawer I., Witkowski S., Analysis of Solid State¹³C NMR Spectra of Biologically Active Compounds, *Current Organic Chemistry*, 2001, 5(10), s. 987- 999.
- [27] Wawer I., Nartowska J., Cichowlas A., ¹³C cross-polarization MAS NMR study of some steroidal saponinins. *Solid State NMR*, 2011, 20, s. 35-47.
- [28] Ahmedova A., Paradowska K., Wawer I., ¹H, ¹³C MAS NMR and DFT GIAO study of quercetin and its complex with Al(III) in solid state, *Journal Inorganic Biochemistry*, 2012, 110, s. 27-35.