

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای فنولی اندام‌های زعفران (*Crocus sativus* L.)

سمیه تاجیک¹، فاطمه زرین کمر^{2*}، وحید نیکنام³

1- دانشجوی دکتری گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

2- دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

3- استاد، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران

* تهران، صندوق پستی 14115-175

zarinkamar@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/12/16 پذیرش مقاله: 95/7/11)

چکیده - در سال‌های اخیر تمایل برای استفاده از منابع گیاهی به علت نقش ترکیبات فیتوشیمیایی و اکسیدان‌ها در حفظ سلامت انسان، افزایش یافته است. ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از ترکیبات بسیار مهم گیاهان هستند که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. هدف از این مطالعه، ارزیابی و مقایسه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف زعفران است که هر ساله مقادیر زیادی از آنها طی فرایند فرآوری زعفران به هدر می‌رود. در این پژوهش، عصاره اندام‌های مختلف زعفران بوسیله متانول (80 درصد) استخراج شد، سپس میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئید کل به ترتیب با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو و روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این اندام‌ها نیز به دو روش احیای رادیکال آزاد DPPH و بتا کاروتن لینولتیک اسید اندازه‌گیری شد. بر طبق نتایج، بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل (6/43 میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) و فلاونوئید کل (1/33 میلی‌گرم روتین در گرم ماده خشک) در کلاله نسبت به دیگر اندام‌ها مشاهده شد. همچنین نتایج هر دو آزمون DPPH و بتا کاروتن لینولتیک اسید نشان داد که کلاله دارای بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به دیگر اندام‌ها می‌باشد. مقایسه ترکیبات فنولیک بین اندام‌های مختلف نشان داد که محتوای این ترکیبات و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بسته به اندام می‌تواند متفاوت باشد، همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر کلاله و گلبرگ نسبت به اندام‌های برگ و کورم می‌تواند به دلیل محتوای بالای ترکیبات فنولیک در این اندام‌ها باشد.

کلیدواژه‌گان: آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولیک، فلاونوئید، زعفران، DPPH.

1- مقدمه

مضر هستند، ایجاد کرده‌اند. آنتی‌اکسیدان‌ها از سیستم‌های بیولوژیک نظیر پروتئین، آمینو اسید، لیپید و DNA، در مقابل صدمات اکسیداتیو تولید شده به‌وسیله گونه‌های

موجودات زنده شبکه آنتی‌اکسیدان پیچیده‌ای را برای خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن که برای زندگی انسان

معدله نیز استفاده می‌شده است. طی دهه اخیر تحقیقات بر روی خصوصیات ضد سرطان و ظرفیت سمیت‌زدایی زعفران، متمرکز شده است [7]. اما نکته قابل ذکر آن است که عمده‌ی این مطالعات به اثرات دارویی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مؤثره کاروتنوئیدی موجود در کلاله‌ی زعفران عمدتاً کرووسین (ترکیب اصلی مسیول رنگ زعفران) معطوف شده است، این در حالی است که هر ساله طی فرایند فراوری زعفران، مقادیر فراوانی از گلبرگ‌ها و برگ‌های این گیاه به دور ریخته می‌شود. تقریباً حدود 350 کیلوگرم گلبرگ، 1500 کیلوگرم برگ‌ها و صدها کرم که به دلیل سایز کوچکشان نمی‌توانند کشت شوند، برای بدست آوردن یک کیلوگرم این طلای سرخ از بین می‌روند و این محصول را در بیومس کل کمتر سودمند می‌سازد [3]. به طور کلی گلبرگ، برگ و کورم تشکیل دهنده‌ی ترکیبات زیست فعال را با فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف و کاربردهای احتمالی می‌دهند [3]. گلبرگ‌های زعفران دارای انواع زیادی از ترکیبات فلاونوئیدی، گلیکوزیدی و آنتوسیانین‌ها می‌باشند [8]. در مطالعات متعدد نیز به تأثیرات ضد افسردگی، ضد التهابی، آنتی‌تیروزینازی و آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران اشاره شده است [9، 10]. از طرفی ارتباط معنی‌دار بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی با محتویات ترکیبات فنولیک آنها به اثبات رسیده است. به همین منظور مطالعات مختلفی به منظور مطالعه‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اندام‌های مختلف گیاهان و تعیین محتوای فنولیک آنها انجام شده است. در مطالعه‌ای که بر روی عصاره‌های مختلف (آبی و الکلی) گلبرگ و کلاله‌ی زعفران انجام شد، وجود ارتباط معنی‌دار بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت بازدارندگی عصاره‌ها مشاهده شد [10]. ترکیبات زیست فعال مهم کورم گلیکو کونجوگه‌های سیتولیتیک و ساپونین‌های تری‌ترپنیک که در پزشکی استفاده می‌شوند هستند، که اخیراً ترکیبات

اکسیژن بازفعال (ROS) حمایت می‌کنند و منجر به کاهش آسیب و یا مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان‌ها می‌شوند [1].

آنتی‌اکسیدان‌ها به دو صورت طبیعی و سنتزی وجود دارند. ترکیبات فنلی TBHQ، BHT و BHA متداول‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی هستند که به کرات از لحاظ سم‌شناسی مطالعه شده‌اند و در سال‌های اخیر استفاده از این نوع آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل تأثیرات جانبی منفی بر سلامتی به میزان زیادی محدود شده است [2]. لذا در سال‌های اخیر، تحقیق برای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جدیدتر، خصوصاً با منشأ گیاهی به علت اهمیت چنین مولکول‌هایی در فارماکولوژی، صنایع آرایشی و غذایی افزایش یافته است [3]. گیاهان منابع غنی از فیتوکمیکال، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و دیگر محصولات با ارزش بیوتکنولوژیکی بالا می‌باشند [4].

در همین راستا و در جهت جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات میوه‌ها، سبزیجات، ادویه‌ها، برگ‌ها، ریشه و پوست درختان به عنوان منابع بالقوه آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی استخراج شده‌اند [2]. ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی که انتشار وسیعی در گیاهان دارند از جمله‌ی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند، آنها همچنین خصوصیات ضد جهشی و ضد سرطانی، حفاظت‌کننده قلبی و فعالیت ضد التهابی و ضد میکروبی دارند [5]. زعفران (*Crocus sativus* L.) یک گونه گیاهی عقیم تریپلوئید متعلق به خانواده Iridaceae می‌باشد که معروفترین گونه جنس *Crocus* است. کلاله‌های خشک شده گل این گونه به عنوان گرانتترین ادویه جهان سال‌هاست که مورد توجه می‌باشد. علاوه بر جنبه غذایی زعفران که تا بحال بیشتر به آن توجه شده است، این گونه از نظر دارویی نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد [6]. از گذشته به دلیل فعالیت‌های ضد اسپاسم و مسکن شناخته شده است و به عنوان محرک

به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی توسط کاغذ صافی فیلتر و برای انجام مطالعات بیوشیمیایی استفاده شد [13].

2-2- سنجش فنل تام

محتوی فنول کل با استفاده از معرف فولین - سیوکالتیو توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. به 0/5 میلی لیتر از محلول رویی 2/5 میلی لیتر معرف ده درصد فولین اضافه و مخلوط حاصل به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس 2 میلی لیتر کربنات سدیم 7/5 درصد به آن اضافه گردید. پس از 90 دقیقه جذب هر نمونه در طول موج 765 نانومتر در برابر بلانک خوانده شد. مقادیر فنول تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه گیری شد [14].

2-3- سنجش فلاونوئید تام

فلاونوئیدهای کل با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد. به 0/5 میلی لیتر از عصاره، 100 میکرو لیتر استات پتاسیم 1 مولار اضافه نموده، بعد از 5 دقیقه، 100 میکرو لیتر کلرید آلومینیوم 10 درصد به محلول اضافه شد. سپس 1/5 میلی لیتر متانول 80% و 2/8 میلی لیتر آب دیونیز به محلول اضافه گردید. پس از 30 دقیقه شدت جذب محلول در طول موج 415 نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئید کل با استفاده از روتین منحنی استاندارد رسم گردید و غلظت فلاونوئیدها بر حسب میلی گرم روتین در گرم وزن خشک ارائه شد [15].

2-3- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

2-3-1- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با روش

پاکسازی رادیکال DPPH

DPPH یا diphenyl-2-diphenylhydrazyl (1,1-picryl-hydrazyl) یک

فنولیک کورم و فعالیت رادیکال اسکاونجینگ آن نیز بررسی شده است [11,12].

اگرچه تاکنون مطالعاتی بر روی خواص آنتی اکسیدانی برخی از اندام های گیاه زعفران به طور جداگانه و یا مقایسه بین دو یا سه اندام مختلف در مناطق مختلف انجام شده است اما تاکنون هیچ گونه مطالعه ای مبنی بر مقایسه ی ترکیبات فیتوشیمیایی (فنولی و فلاونوئیدی کل) و خصوصیات آنتی اکسیدانی همزمان اندام های کلاله، گلبرگ، برگ و کورم انجام نشده است که در این مطالعه مورد بررسی و ارزیابی قرار خواهند گرفت.

2- مواد و روش ها

کورم های گیاه زعفران *Crocus sativus* L. در تیرماه سال 92 از مزارع شهرستان تربت حیدریه تهیه شد، سپس کورم ها وزن شدند و نمونه های درشت تر و سالم تر و بدون زخم و خراشیدگی انتخاب شدند (میانگین وزن کورم ها 10/35)، کورم ها به مدت 20 دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم 20 درصد دارای 5 درصد کلر فعال ضد عفونی سطحی و با آب مقطر آبکشی شدند و در گلدان هایی به قطر 15 و عمق 13 در بستر پرلیت کاشته و در اواخر شهریور آبیاری شدند. پس از جوانه زنی در مهرماه آبیاری گلدان ها با محلول هوگلند 1/2 هر هفته دو بار و به مقدار 100 میلی لیتر صورت گرفت. در آبان ماه نیز همزمان با ظهور گل ها، اندام های مختلف کلاله، گلبرگ، برگ و کورم برای آنالیزهای بیوشیمیایی برداشت شد و درآون با دمای 60 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت خشک، سپس آسیاب گردیدند.

2-1-2- تهیه عصاره جهت مطالعات بیوشیمیایی

0/1 گرم از پودر نمونه ها توسط 10 میلی لیتر متانول 80 درصد در حمام آب گرم به مدت 3 ساعت با دمای 70 درجه عصاره گیری شد. سپس مخلوط حاضر در 5000

محلول استوک تهیه شد، سپس حلال به‌وسیله روتاری تبخیر شد و 100 میلی‌لیتر آب مقطر اکسیژن‌دار همراه با تکان شدید به استوک اضافه شد. سپس 2/5 میلی‌لیتر از مخلوط واکنش به لوله‌های مورد آزمایش حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اضافه شد و مخلوط در 50 درجه در بن‌ماری انکوبه شد و جذب در 490 نانومتر در فواصل زمانی هر 15 دقیقه به مدت 2 ساعت خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از فرمول (2) محاسبه شد.

$$AA\% = 100 \left[1 - \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0 - A^0t)} \right] \quad (2)$$

در رابطه (2)، A_0 و A^0t به ترتیب، جذب نمونه و کنترل در زمان شروع و A_t جذب نمونه و کنترل بعد از گذشت زمان 2 ساعت می‌باشد. نمونه کنترل به جای عصاره‌ی گیاهی حاوی متانول بود.

4-2- آنالیزهای آماری

همه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شد. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها، از بسته‌ی نرم‌افزاری اکسل استفاده شد. آنالیز واریانس با استفاده از (ANOVA) یکطرفه و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در بسته نرم‌افزاری SPSS در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

3- نتایج

3-1- سنجش ترکیبات فنولی و فلاونویدی کل

مقایسه میانگین داده‌های فنل کل و فلاونوید کل عصاره گیاه حاکی از تفاوت معنی‌دار این ترکیبات در اندام‌های مختلف می‌باشد. همان‌طور که نمودار 1 نشان می‌دهد کلاه با میزان $(6/43 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW})$ دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی می‌باشد و بعد از آن به ترتیب گلبرگ $(4/35 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW})$ ، کورم $(1/49 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW})$ ، و برگ

رادیکال آزاد ناپایدار است که می‌تواند یک الکترون یا رادیکال هیدروژن دریافت کند و به حالت پایدار درآید. به علت وجود الکترون منفرد در ساختمان DPPH، این رادیکال در طول موج 517 نانومتر دارای جذب خوبی می‌باشد و هرگاه در حضور یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی قرار بگیرد که فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد داشته باشد، رنگ آن زایل شده و کاهش جذب در طول موج 517 نانومتر، بیانی از فعالیت نمونه آنتی‌اکسیدان خواهد بود [16]. برای ارزیابی فعالیت پاکسازی عصاره‌ها، 2/5 میلی‌لیتر از محلول متانولی 0/004 گرم DPPH را به 0/5 میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف (200، 300، 400، 500) میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های گیاه اضافه نموده و جذب آن پس از 30 دقیقه در 517 نانومتر قرائت شد [17]. درصد مهار یا احیای DPPH توسط ترکیب آنتی‌اکسیدان از رابطه (1) قابل محاسبه است:

$$AA\% = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

در رابطه‌ی (1)، A_0 جذب کنترل منفی است، جذب عصاره A_1/Asc می‌باشد. اساس اطلاعات حاصل، IC_{50} عصاره (غلظتی از سوبسترا بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر که برای احیای رادیکال DPPH به میزان 50% اولیه نیاز است)، از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره بدست آمد، IC_{50} کمتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌باشد. از ترکیب آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

2-3-2- سنجش خصوصیت آنتی‌اکسیدانی به روش بتاکاروتن لینولئیک اسید

این روش با اندکی تغییر از روش Gursoy و همکاران در سال 2009 انجام شده است، 0/5 میلی‌گرم بتاکاروتن در 1 میلی‌لیتر کلروفرم حل شد [18]، سپس 25 میکرولیتر لینولئیک اسید و 200 میلی‌گرم tween 80 برای تهیه

اعمال متفاوت جهت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد استفاده می‌کنند، به همین دلیل معمولاً در ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی، از سیستم‌های مدل متفاوتی نیز استفاده می‌شود [19]، در مطالعه حاضر از دو روش به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH و سیستم بتا کاروتن لینولئیک اسید استفاده شده است.

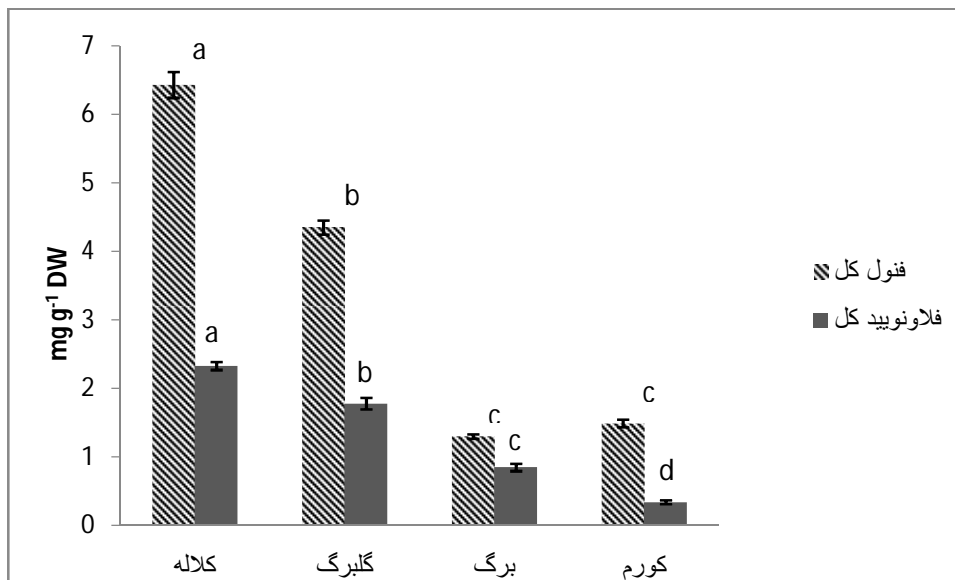
($1/3 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) می‌باشند. نتایج حاصل از سنجش محتوای فلاونوئید عصاره‌ها نیز بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم نشان داد کلاله بالاترین محتوای فلاونوئیدی را دارا بود ($2/33 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) و بعد از آن به ترتیب گلبرگ، برگ و کورم با مقادیر ($\text{mg g}^{-1} \text{ DW}$) $(1/78, 0/85, 0/34)$ قرار گرفتند (شکل 1، جدول 1).

3-2- سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

گیاهان برای بقا در مقابل تغییرات محیط اکسیداتیو اطرافشان، از طیف متنوعی از مولکول‌ها با ساختارها و

3-3- فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH

بررسی فعالیت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.



شکل 1 مقایسه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل در اندام‌های مختلف زعفران *Crocus sativus*

جدول 1 میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره اندام‌های مختلف *Crocus sativus*

اندام	فنول کل (میلی گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره)	فلاونوئید کل (میلی گرم روتین بر گرم عصاره)
کلاله	6/43±0/19	2/33±0/06
گلبرگ	4/35±0/1	1/78±0/08
برگ	1/3±0/03	0/85±0/05
کورم	1/49±0/05	0/34±0/03

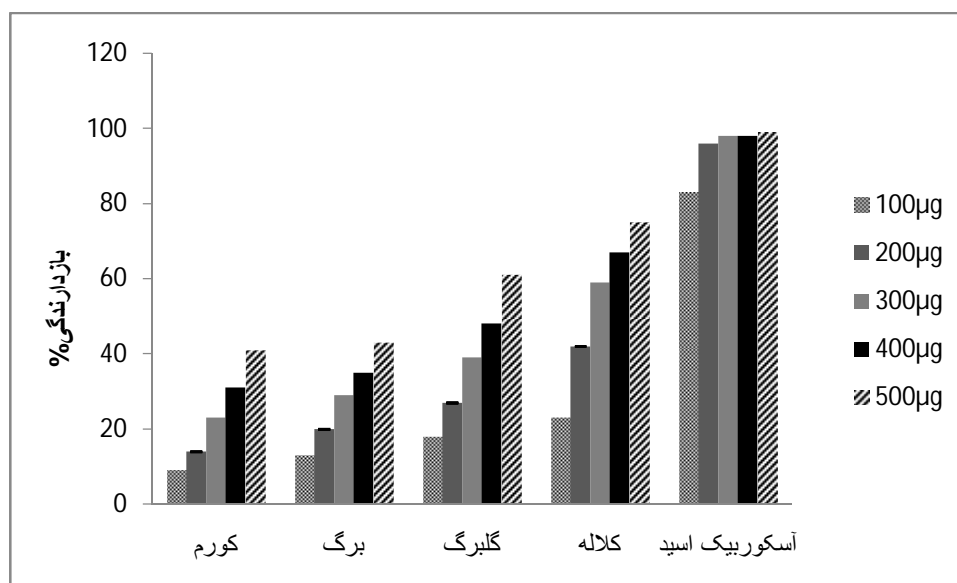
می‌باشد. البته ظرفیت آنتی‌اکسیدانی همه‌ی عصاره‌ها از آسکوربیک اسید که به عنوان استاندارد در نظر گرفته شده است، کمتر می‌باشد (IC₅₀:10/17) (شکل 3).

3-4- سنجش آنتی‌اکسیدانی به روش بتا کاروتن لینولینک اسید

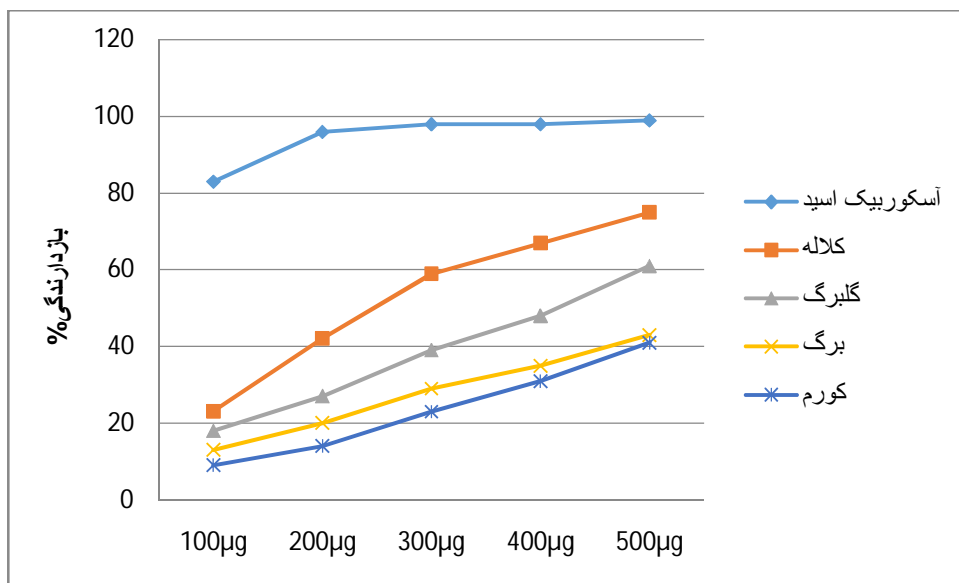
به علت تنوع سیستم‌های مختلف پراکنده کننده‌ی رادیکالی گیاهی، سیستم‌های مدل مختلفی برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در محیط آزمایشگاهی توصیه می‌شود؛ یکی از این روش‌ها مدل بتا کاروتن- لینولینک اسید است که به طور وسیعی برای مطالعه‌ی پیشرفت اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع استفاده می‌شود. در این روش رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیداسیون اسیدهای چرب به بتا کاروتن غیر اشباع حمله می‌کنند و در این فرایند باندهای غیر اشباع بتا کاروتن از دست می‌رود و رنگ نارنجی بتا کاروتن ناپدید می‌شود. در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون آن توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌شود و رنگ نارنجی حفظ می‌شود [3].

در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط آنتی‌اکسیدان کاهش یافته و به رنگ زرد تبدیل می‌شود. درجه بی‌رنگ شدن این ترکیب، بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان مربوطه می‌باشد.

در شکل 2 میزان بازدارندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های 100، 200، 300، 400 و 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی اندام‌های مختلف کلاله، گلبرگ، برگ و کورم در برابر اسید آسکوربیک به عنوان شاهد ارائه شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، عصاره‌ی اندام‌های مختلف توانایی آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را نشان می‌دهند. در این بین، کلاله نسبت به اندام‌های گلبرگ، برگ و کورم دارای بیشترین درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد بود (درصد بازدارندگی 75% در غلظت 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر). فعالیت آنتی‌اکسیدانی همه‌ی عصاره‌ها وابسته به غلظت می‌باشد و با افزایش غلظت عصاره این خاصیت نیز افزایش می‌یابد (شکل 2). مقادیر IC₅₀ برای عصاره‌های کلاله، گلبرگ، برگ و کورم به ترتیب، 275، 406، 593 و 625 میکروگرم بر میلی‌لیتر



شکل 2 فعالیت آنتی رادیکالی عصاره متانولی اندام‌های زعفران در مقایسه با اسید آسکوربیک در روش DPPH



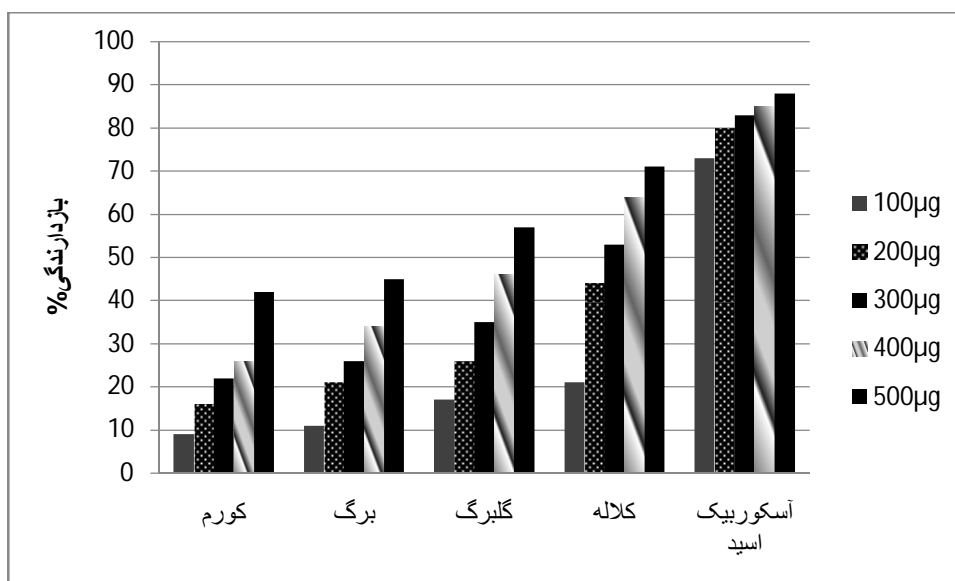
شکل 3 منحنی کالیبراسیونی قدرت بازدارندگی عصاره های اندامهای مختلف در مقابل ASc در روش DPPH

4- بحث

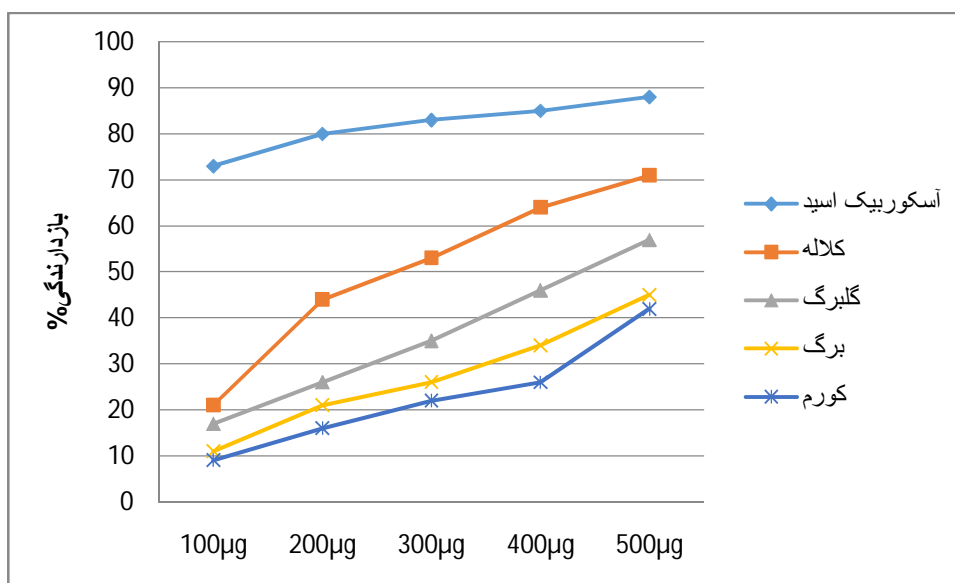
از آنجا که گیاهان همواره در معرض شرایط اکسیداتیو محیط اطرافشان قرار دارند، دارای انواع متفاوتی از آنتی اکسیدانها با ساختار و اعمال متفاوت می باشند، واضح است که تنها یک روش نمی تواند پیش بینی جامعی از تأثیر تمام پارامترهای درگیر در ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه ارائه دهد [19]، بنابراین در مطالعه‌ی حاضر از دو روش مختلف DPPH و بتاکاروتن برای ارزیابی خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره‌ی اندامهای مختلف در زعفران استفاده شد [20,26].

مطالعه میزان ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی اندامهای مختلف زعفران وجود اختلاف معنی دار را در محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، همچنین خصوصیات آنتی اکسیدانی اندامهای مختلف را نشان داد. بر طبق جدول 1، کلاله دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می باشد. محتوای پلی فنولها در گیاهان به عوامل مختلفی بستگی دارد و بسته به عملگردها، گونه، وارسته، اندام و مرحله‌ی فیزیولوژیک می تواند متفاوت باشد [21-23].

بنابراین جذب بالا نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر می باشد. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی اندامهای مختلف با روش رنگبری بتاکاروتن نیز نتایج حاصل از بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH را تأیید کرد و کلاله (با درصد بازدارندگی 71% در غلظت 500 میکروگرم بر میلی لیتر) بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نسبت به دیگر اندامها نشان داد (شکل 4). در این روش نیز با افزایش غلظت عصاره‌ها ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها نیز افزایش یافت. مقادیر IC50 محاسبه شده برای عصاره‌های کلاله، گلیسرگ، برگ و کورم به ترتیب (251، 450، 544 و 590 میکروگرم بر میلی لیتر) می باشد. آسکوربیک اسید نیز که به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در این مدل استفاده شد با IC50:13/7 میکروگرم بر میلی لیتر دارای بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی نسبت به عصاره‌های اندامهای مختلف بود (شکل 5). البته کلاله در غلظت 500 میکروگرم بر میلی لیتر با ظرفیت آنتی اکسیدانی 71% با غلظت 100 میکروگرم بر میلی لیتر آسکوربیک اسید که دارای فعالیت آنتی رادیکالی 73% است تقریباً قابل مقایسه می باشد.



شکل 4 درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید عصاره متانولی اندام‌های مختلف در روش بتاکاروتن- لینولئیک اسید



شکل 5 منحنی کالیبراسیونی قدرت بازدارندگی عصاره‌های اندام‌های مختلف در مقابل Asc در روش بتاکاروتن-لینولئیک اسید

از تأثیر تمام پارامترهای درگیر در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ارائه دهد [19]. بنابراین در مطالعه‌ی حاضر از دو روش مختلف DPPH و بتاکاروتن برای ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اندام‌های مختلف استفاده شد، بسته به روش سنجش بکار برده شده عصاره-های گیاهی توانایی آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را نشان می-

همچنین در مطالعات دیگر نیز به پراکنش متفاوت متابولیت‌های ثانویه بسته به اندام اشاره شده است [23-25]. از آنجا که گیاهان همواره در معرض شرایط اکسیداتیو محیط اطرافشان قرار دارند، دارای انواع متفاوتی از آنتی‌اکسیدان‌ها با ساختار و اعمال متفاوت می‌باشند، واضح است که تنها یک روش نمی‌تواند پیش‌بینی جامعی

آنتی‌اکسیدانی برگ نسبت به کورم در هر دو مدل بتاکاروتن و DPPH بالاتر بود، هماهنگ است [4]. البته نکته‌ی قابل ذکر آن است که وجود تفاوت در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این اندام‌ها در مطالعات مختلف می‌تواند به دلایل ژنوتیپ، تفاوت‌های محیطی که گونه در آن حضور دارد و اندام‌های مورد مطالعه و زمان نمونه برداری نسبت داده شود [30].

در این مطالعه توانایی بالای آنتی‌اکسیدانی کلاله نسبت به دیگر اندام‌ها می‌تواند به دلیل میزان بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در این اندام نسبت به دیگر قسمت‌ها باشد (شکل 1). همان‌طور که نتایج حاصل از مطالعه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلاله زعفران وجود ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی این اندام را با ترکیبات فنولی موجود در آن بیان کرد، همچنین عنوان شد، ادویه‌های با محتوای بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان می‌دهند [31]. در پژوهشی دیگر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله‌ی زعفران حتی بالاتر از گیاهان گوچه‌فرنگی و هویج گزارش شده است [7].

البته نکته‌ای که قابل توجه است، تاکنون در هیچ مطالعه‌ای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف زعفران هم‌زمان با هم مقایسه نشده است، حداکثر اغلب بین دو یا سه اندام مطالعه صورت گرفته است که در این پژوهش مقایسه ترکیبات فیتوشیمیایی و اثرات آنتی‌اکسیدانی چهار اندام کلاله، گلبرگ، برگ و کورم به طور هم‌زمان انجام پذیرفت، که نتایج حاکی از وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف زعفران به خصوص کلاله می‌باشد. البته در این مطالعه تنها ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کلاله‌ی زعفران مورد ارزیابی قرار گرفت و ترکیبات دیگر اصلی کلاله شامل کاروتنوئید کروسین، پیکروکروسین و سافرانال که به ترتیب مسئول رنگ، طعم و عطر زعفران می‌باشند مد نظر قرار نگرفتند، حال آنکه در مطالعات مختلف به اهمیت دارویی و آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات

دهند [26]. همان‌طور که نتایج حاکی از مطالعه‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف در دو سیستم نشان داد توانایی آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مشابه در دو روش اندکی با هم متفاوت می‌باشند (شکل‌های 3 و 5)، که این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل اختلاف در خصوصیتی مانند نوع سوبسترا، شرایط واکنش، روش‌های کمی کردن داده‌ها باشد [27]. اما در هر دو روش کلاله دارای بالاترین خصوصیت آنتی‌اکسیدانی و بعد از آن به ترتیب گلبرگ، برگ و کورم قرار دارند (شکل‌های 2 و 4). تنوع فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط با اندام درهالوفیت‌ها گزارش شده است [28]. چنین روندی نیز برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف گونه *Salvia* نیز بیان شده است [29]. در مطالعات مختلف، تنوع فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف به حضور آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی اساساً پلی‌فنول‌ها که بسته به عمل اندام / بافت متفاوت هستند نسبت داده شده است [15]. در این مطالعات به رابطه‌ی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی و حضور ترکیبات فیتوشیمیایی همچون آنتوسیانین‌ها، فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها و تانن‌ها اشاره شده است [2]. در مطالعه‌ای که بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی سه اندام کلاله، کورم و برگ زعفران با روش مهار رادیکال DPPH انجام شد، به ترتیب کلاله با مقدار $IC_{50} (207 \mu g ml^{-1})$ بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پس از آن به ترتیب کورم ($246 \mu g ml^{-1}$) و برگ ($482 \mu g ml^{-1}$) قرار گرفتند [19] که با نتایج حاصل از این مطالعه که به ترتیب کلاله، گلبرگ، برگ و کورم قرار گرفتند متفاوت می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر با مقادیر $IC_{50} (593 \mu g ml^{-1})$ و $(544 \mu g ml^{-1})$ به ترتیب در دو روش DPPH و بتاکاروتن لیئوئیک اسید، برگ از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به کورم برخوردار بود، این یافته با نتایج حاصل از مطالعه‌ای که بین اندام‌های گلبرگ، برگ و کورم زعفران در اسپانیا انجام شد و در آن نیز ظرفیت

- 169.
- [3] Sanchez-Vioquea, b. R., Rodreguez-Condea M., Reina-Ureñaa J., Escolano-Terceroa M., Herraiz-Peñalvera D. Santana-Méridasa, b (2012). In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products* 39, 149–153.
- [4] Ghasemzadeh A., Jaafar H., Karimi E., Ibrahim M. (2012). Combined effect of CO₂ enrichment and foliar application of salicylic acid on the production and antioxidant activities of anthocyanin, flavonoids and isoflavonoids from ginger. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 1-12.
- [5] Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chem.*, 105: 940–949.
- [6] Goli S. A.H, Mokhtari F & Rahimmalek M (2012). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal. *Journal of Agricultural Science*; 4, 175-181.
- [7] Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med*. 2002; 227: 20-25.
- [8] Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., and Kader, A.A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4976-4982.
- [9] Li, C.Y., Lee, E.J., Wu, T.S., (2004). Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*. *J. Nat. Prod.* 67, 437–440.
- [10] Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M., (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petals extracts in mice. *BMC Pharmacol.* 2, 1–8.
- [11] Fernández, J.A., (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Res. Dev. Plant Sci.* 2, 127–159.
- [12] Esmaeili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., Safarian, S., (2011). Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. *Phcog. Mag.* 7, 74–80

اشاره شده است و توان آنتی‌اکسیدانی بالای زعفران را بیش از هر چیز به کروسین که رنگیزه‌ی اصلی زعفران است ارتباط داده اند [۳۲،۳۳]. به طور کلی، توان آنتی‌اکسیدانی بالای کلاله‌ی زعفران می‌تواند نتیجه‌ی اثرات سینرژیسیم ترکیبات فعال موجود در آن باشد که نباید مورد چشم پوشی قرار گیرند [36-34].

5- نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشان داده شد که در بین اندام‌های مختلف زعفران، عصاره متانولی کلاله اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر و میزان فنل و فلاونوئید بیشتری نسبت به اندام‌های گلبرگ، برگ و کورم دارد. اگرچه خصوصیت آنتی‌اکسیدانی کلاله زعفران که به عنوان ادویه مورد استفاده قرار می‌گیرد حایز اهمیت می‌باشد، اما در این مطالعه، مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی کلاله با دیگر قسمت‌های زعفران مشخص کرد که اندام‌های دیگر نیز که هر ساله به میزان زیادی طی فراوری زعفران به اتلاف می‌روند، نیز دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی می‌باشند. همان‌طور که الگوی خواص آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و بتا کاروتن لینولئیک اسید به ترتیب از بیشترین به کمترین گلبرگ، برگ و کورم می‌باشد. لذا با توجه به سطح زیر کشت گسترده این محصول و تولید بالای محصولات جانبی کشاورزی و با در نظر گرفتن خواص آنتی‌اکسیدانی دیگر اندام‌ها علاوه بر کلاله، این بخش‌ها نیز می‌توانند به عنوان منابع آنتی‌اکسیدانی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

6- منابع

- [1] Shrififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18: 800-805.
- [2] Naczki, M., Amarowicz, R., Zadernowski, R., Pegg, R., Shahidi, F. (2003). Antioxidant activity of crude phenolic extracts from wild blueberry leaves. *Vol. 12/53, SI 1, pp.* 166–

- [23] Trabelsi, N., Falleh H., Jallali I., Daly A., Hajlaoui H., Smaoui A., Abdelly C., Ksouri R (2012). Variation of phenolic composition and biological activities in *Limoniastrum monopetalum* L organs. *Acta Physiol Plant.* 34:87–96.
- [24] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bourauoi, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C. R. Biologies.* 331 372–379.
- [25] Lisiewska, Z., Kmiecik, W., Korus, A. (2006). Content of vitamin C, carotenoids, chlorophylls and polyphenols in green parts of dill (*Anethum graveolens* L.) depending on plant height, *Journal of Food Composition and Analysis.* 19 134–140.
- [26] Gardner, P.T., White, T.A.C., McPhail, D.B., and Duthie, G.C. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry* 68: 471-474.
- [27] Conforti, F., Statti, G. A. and Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry* 102: 1096–1104.
- [28] Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Hamdi, B., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Magné, C., Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2083–2091.
- [29] Matkowski, A., Zielin´ska, S., Oszmian´ski, J., Lamer-Zarawska, E (2008). Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. *Biores. Technol.* 99, 7892–7896
- [30] Shan, B.; Cai, Y.Z.; Sun, M.; Corke, H (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7749-7759.
- [31] Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H. Z. E (2010). Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, 15, 6244-6256
- [32] Akhondzadeh BA, Ghoreishi SA, Noorbala AA, Akhondzadeh SH, Rezazadeh SH (2008).
- [13] Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. (2002). Phenolics content in *Astragalus* species. *Pak. J. Bot.*, 34 (3): 283-289.
- [14] Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85, 267-273.
- [15] Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary calorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*; 10: 178-18.
- [16] Singh, R. P., Murthy, K. N. C., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 81-86.
- [17] Braca, N.D. Tommasi, L.D. Bari, C. Pizza, M. Politi, I. Morelli (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod.*, 64, 892–895.
- [18] Gursoy, N., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., & Solak, M. H. (2009). Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven morchell species. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2381-2388.
- [19] Ahmad B. S., Malik A. H., Wani Z. A., Mohiuddin T., Shah Z., Abbas N., Ashraf N. (2015). Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. *South African Journal of Botany* 99, 80–87.
- [20] Falleh, H., Ksouri, R., Medini, F., Guyot, S., Abdelly, C., Magné, C. (2011). Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products* 34.
- [21] Carbone, K., Giannini B., Picchi V., Lo Scalzo R., Cecchini F. (2011). Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chemistry*. 127, 493–500.
- [22] Carvalho IS, Cavaco T., Brodelius M. (2011). Phenolic composition and antioxidant capacity of six *Artemisia* species. *IND Crop Prod.* 33, 382–388.

- Effects of Salicylic Acid on Carotenoids and Antioxidant Activity of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Applied food biotechnology*. 2: 33-37.
- [35] Mashmoul M., Azlan A., Khazaai Mohd Yusof B.N., Mohd N.S. (2013). Saffron: a natural potent antioxidant as a promising anti-obesity drug. *Antioxidant*. 2: 293-308.
- [36] Assimopoulou, A., Sinakos, Z., Papageorgiou, P. (2005). Radical Scavenging Activity of *Crocus sativus* L. Extract and its Bioactive Constituents. *Phytother. Res*. 19, 997–1000.
- Petal and stigma of *Crocus sativus* L. in the treatment of depression: A pilot double-blind randomized trial. *J Med Plants.*; 7: 29-36.
- [33] Chen Y., Zhang H., Tian X., Zhao C., Cai L., Liu Y., Jia L., Yin HX., Chen C. (2008). Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L. A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chem*. 109: 484-492.
- [34] Tajik S., Zarinkamar F., Niknam V. (2015).