

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی می‌باشند. هدف از این مطالعه، ارزیابی و مقایسه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل و همچنین ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی 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 میلی گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) و فلاونوئید کل (1/33 میلی گرم 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 آنتی اکسیدانی نسبت به دیگر اندام‌ها می‌باشد. مقایسه ترکیبات فنولیک بین اندام‌های مختلف نشان داد که محتوای این ترکیبات و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی بسته به اندام می‌تواند متفاوت باشد، همچنین ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتر کلاله و گلبرگ نسبت به اندام‌های برگ و کورم می‌تواند به دلیل محتوای بالای ترکیبات فنولیک در این اندام‌ها باشد.

کلیدواژگان: آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولیک، فلاونوئید، زعفران، DPPH.

1- مقدمه

مضر هستند، ایجاد کرده‌اند. آنتی اکسیدان‌ها از سیستم‌های بیولوژیک نظیر پروتئین، آمینو اسید، لیپید و DNA، در مقابل صدمات اکسیداتیو تولید شده به وسیله گونه‌های

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

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

آنتی اکسیدان‌ها به دو صورت طبیعی و سنتزی وجود دارند. ترکیبات فنلی TBHQ، BHT و BHA متداول‌ترین آنتی اکسیدان‌های سنتزی هستند که به کرات از لحاظ سم‌شناسی مطالعه شده‌اند و در سال‌های اخیر استفاده از این نوع آنتی اکسیدان‌ها به دلیل تأثیرات جانبی منفی بر سلامتی به میزان زیادی محدود شده است [2]. لذا در سال‌های اخیر، تحقیق برای آنتی اکسیدان‌های طبیعی جدیدتر، خصوصاً با منشا 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 آنتی اکسیدان‌های سنتزی با آنتی اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات میوه‌ها، سبزیجات، ادویه‌ها، برگ‌ها، ریشه و پوست درختان به عنوان منابع بالقوه آنتی اکسیدانت‌های طبیعی استخراج شده‌اند [2]. ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی که انتشار وسیعی در گیاهان دارند از جمله آنتی اکسیدان‌های طبیعی هستند، آنها همچنین خصوصیات ضد جهشی و ضد سرطانی، حفاظت کننده 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

معدۀ 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 آنتی اکسیدانی 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، آنتی تیروزینازی و آنتی اکسیدانی گلبرگ زعفران اشاره شده است [9، 10]. از طرفی ارتباط معنی‌دار بین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی با محتویات ترکیبات فنولیک آنها به اثبات رسیده است. به همین منظور مطالعات مختلفی به منظور مطالعه‌ی ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 تری ترپنیک که در پزشکی استفاده می‌شوند هستند، که اخیراً ترکیبات

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

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

2- مواد و روش‌ها

کورم‌های گیاه زعفران *Crocus sativus* L. در تیرماه سال 92 از مزارع شهرستان تربت حیدریه تهیه شد، سپس کورم‌ها وزن شدند و نمونه‌های درشت‌تر و سالم‌تر و بدون زخم و خراشیدگی انتخاب شدند (میانگین وزن کورم‌ها 10/35)، کورم‌ها 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 گلدان‌هایی به قطر 15 و عمق 13 در بستر پرلیت کاشته و در اواخر شهریور آبیاری شدند. پس از جوانه‌زنی در مهرماه آبیاری گلدان‌ها با محلول هوگلند 1/2 هر هفته دو بار و به مقدار 100 میلی‌لیتر صورت گرفت. در آبان ماه نیز هم‌زمان با ظهور گل‌ها، اندام‌های مختلف کلاله، گلبرگ، برگ و کورم برای آنالیزهای بیوشیمیایی برداشت شد و درآون با دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت خشک، سپس آسیاب گردیدند.

2-1- تهیه عصاره جهت مطالعات بیوشیمیایی

0/1 گرم از پودر نمونه‌ها توسط 10 میلی‌لیتر متانول 80 درصد در حمام آب گرم به مدت 3 ساعت با دمای 70 درجه عصاره‌گیری شد. سپس مخلوط حاضر در 5000

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 اندازه‌گیری شد. به 0/5 میلی‌لیتر از محلول رویی 2/5 میلی‌لیتر معرف ده درصد فولین اضافه و مخلوط حاصل به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس 2 میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری شد [14].

2-3- سنجش فلاونوئید تام

فلاونوئیدهای کل با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد. به 0/5 میلی‌لیتر از عصاره، 100 میکرولیتر استات پتاسیم 1 مولار اضافه نموده، بعد از 5 دقیقه، 100 میکرولیتر کلرید آلومینیوم 10 درصد به محلول اضافه شد. سپس 1/5 میلی‌لیتر متانول 80% و 2/8 میلی‌لیتر آب دیونایز 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 میلی‌گرم روتین در گرم وزن خشک ارائه شد [15].

2-3- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

2-3-1- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با روش

پاکسازی رادیکال DPPH

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

محلول استوک تهیه شد، سپس حلال به وسیله روتاری تبخیر شد و 100 میلی لیتر آب مقطر اکسیژن دار همراه با تکان شدید به استوک اضافه شد. سپس 2/5 میلی لیتر از مخلوط واکنش به لوله های مورد آزمایش حاوی غلظت های مختلف عصاره اضافه شد و مخلوط در 50 درجه در بن ماری انکوبه شد و جذب در 490 نانومتر در فواصل زمانی هر 15 دقیقه به مدت 2 ساعت خوانده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از فرمول (2) محاسبه شد.

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

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

4-2- آنالیزهای آماری

همه آزمایش ها در سه تکرار مستقل انجام شد. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها، از بسته ی نرم افزاری اکسل استفاده شد. آنالیز واریانس با استفاده از (ANOVA) یکطرفه و مقایسه میانگین ها توسط آزمون دانکن در بسته نرم افزاری SPSS در سطح احنمال 5 درصد انجام شد.

3- نتایج

3-1- سنجش ترکیبات فنولی و فلاونویدی کل

مقایسه میانگین داده های فنل کل و فلاونوید کل عصاره گیاه حاکی از تفاوت معنی دار این ترکیبات در اندام های مختلف می باشد. همان طور که نمودار 1 نشان می دهد کلاله با میزان ($6/43 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی می باشد 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 می تواند 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 می باشد و هرگاه در حضور یک ترکیب آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان خواهد بود [16]. برای ارزیابی فعالیت پاکسازی عصاره ها، 2/5 میلی لیتر از محلول متانولی 0/004 گرم DPPH را به 0/5 میلی لیتر از غلظت های مختلف (200، 300، 400، 500) میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره های گیاه اضافه نموده و جذب آن پس از 30 دقیقه در 517 نانومتر قرائت شد [17]. درصد مهار یا احیای DPPH توسط ترکیب آنتی اکسیدان از رابطه (1) قابل محاسبه است:

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

در رابطه ی (1)، A_0 جذب کنترل منفی است، جذب عصاره A_1/A_{Sc} می باشد. اساس اطلاعات حاصل، IC₅₀ عصاره (غلظتی از سوبسترا بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر که برای احیای رادیکال DPPH به میزان 50% اولیه نیاز است)، از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت های مختلف عصاره بدست آمد، IC₅₀ کمتر نشان دهنده ی ظرفیت آنتی اکسیدانی بیشتر می باشد. از ترکیب آنتی اکسیدانی آسکوربیک اسید نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

2-3-2- سنجش خصوصیت آنتی اکسیدانی به روش بتاکاروتن لینولئیک اسید

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

($1/3 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) 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).

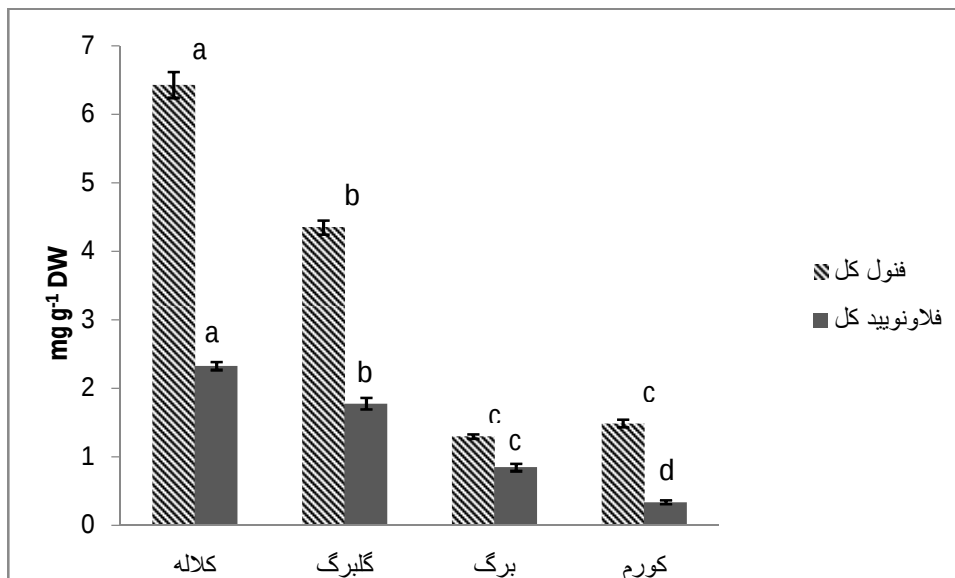
اعمال متفاوت جهت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد استفاده می‌کنند، به همین دلیل معمولاً در ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی، از سیستم‌های مدل متفاوتی نیز استفاده می‌شود [19]، در مطالعه حاضر از دو روش به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH و سیستم بتا کاروتن لینولینیک اسید استفاده شده است.

2-3- سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

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

3-3- فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی می باشد.



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 اسید گالیک 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

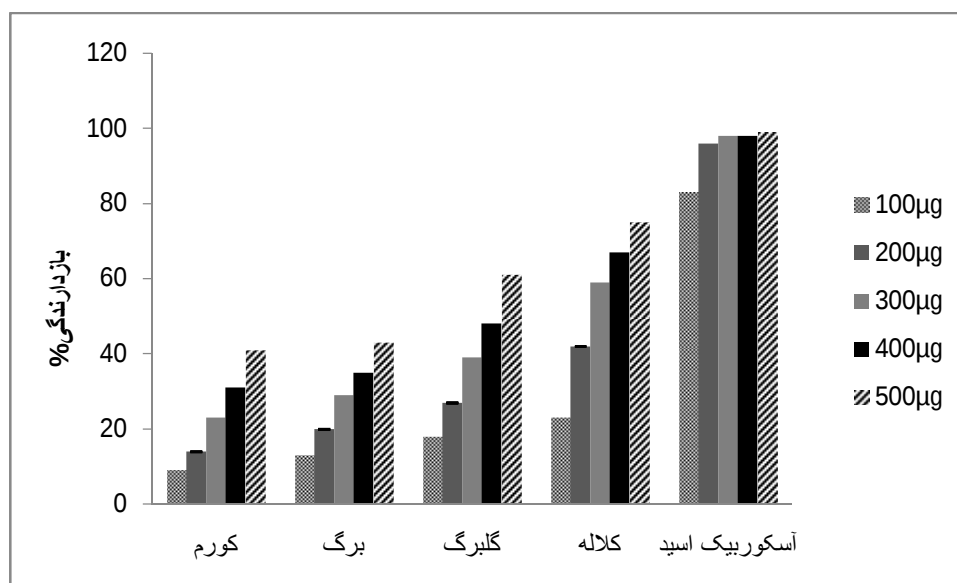
می‌باشد. البته ظرفیت آنتی اکسیدانی همه‌ی عصاره‌ها از آسکوربیک اسید که به عنوان استاندارد در نظر گرفته شده است، کمتر می‌باشد (IC₅₀:10/17) (شکل 3).

3-4- سنجش آنتی اکسیدانی به روش بتا کاروتن لینولئیک اسید

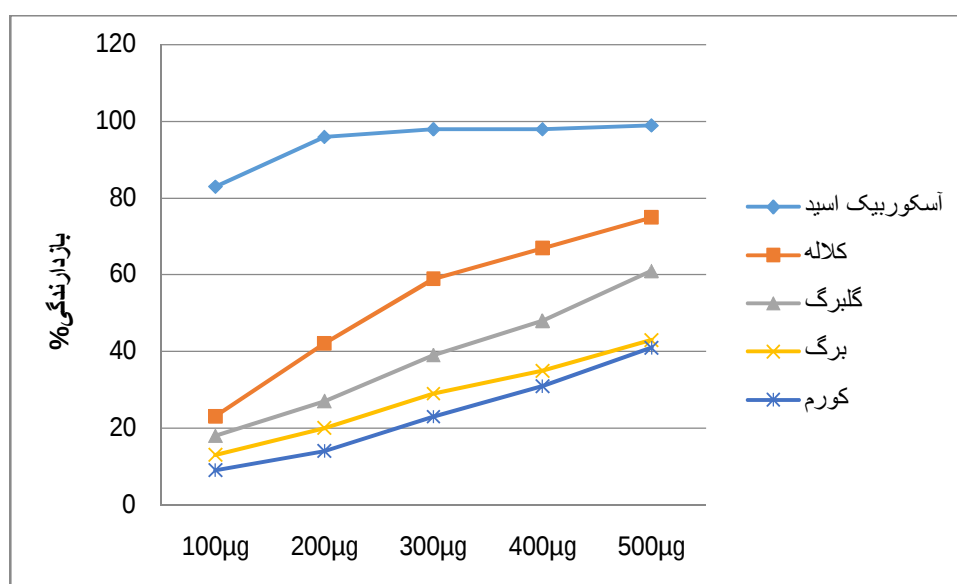
به علت تنوع سیستم‌های مختلف پراکنده کننده‌ی رادیکالی گیاهی، سیستم‌های مدل مختلفی برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها در محیط آزمایشگاهی توصیه می‌شود؛ یکی از این روش‌ها مدل بتا کاروتن- لینولئیک اسید است که به طور وسیعی برای مطالعه‌ی پیشرفت اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع استفاده می‌شود. در این 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 آنتی اکسیدان‌ها از اکسیداسیون آن توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌شود و رنگ نارنجی حفظ می‌شود [3].

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



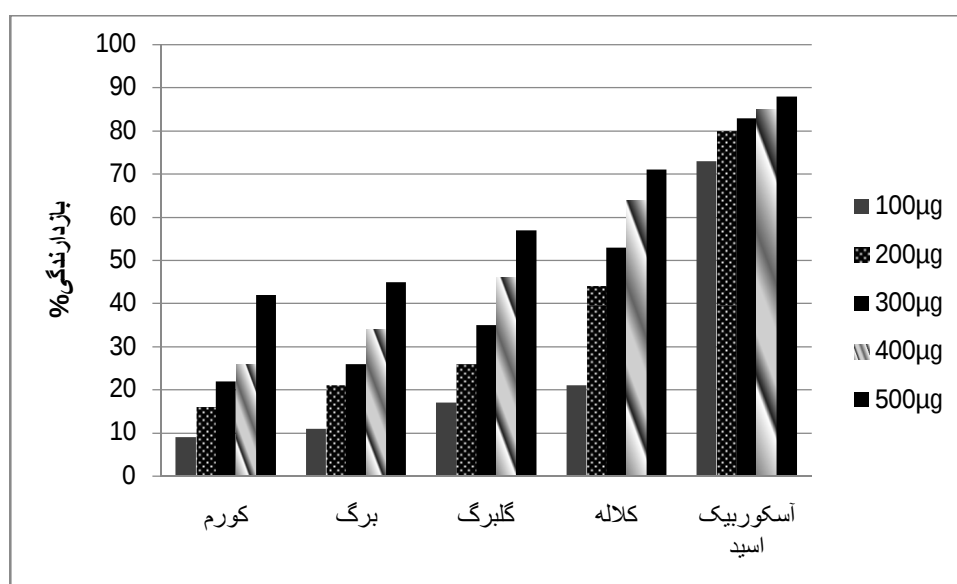
شکل 3 منحنی کالیراسیونی قدرت بازدارندگی عصاره های اندامهای مختلف در مقابل ASc در روش DPPH

4- بحث

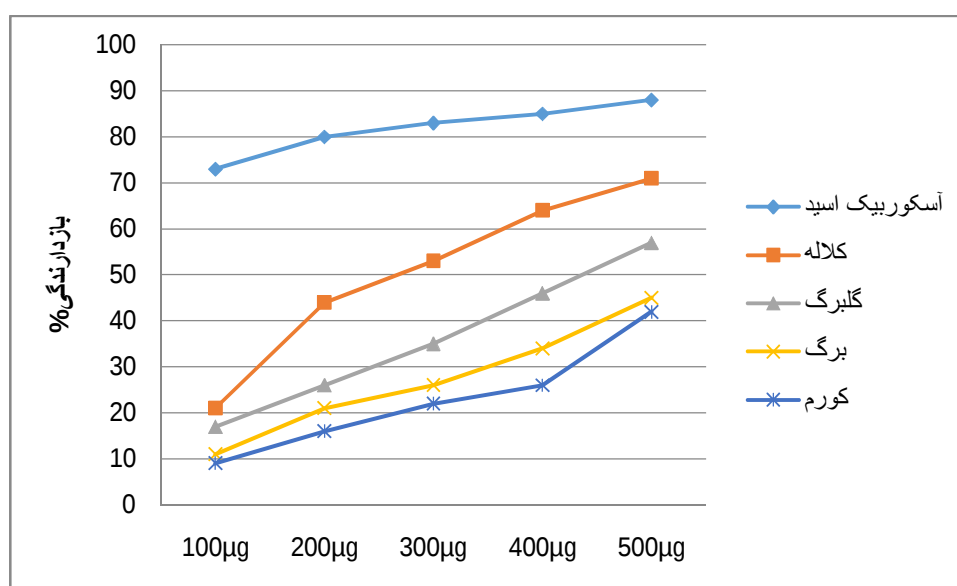
از آنجا که گیاهان همواره در معرض شرایط اکسیداتیو محیط اطرافشان قرار دارند، دارای انواع متفاوتی از آنتی اکسیدانها با ساختار و اعمال متفاوت می باشند، واضح است که تنها یک روش نمی تواند پیش بینی جامعی از تأثیر تمام پارامترهای درگیر در ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه ارائه دهد [19]، بنابراین در مطالعه ای حاضر از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

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 عملکرد گونه، واریته، اندام و مرحله ای فیزیولوژیک می تواند متفاوت باشد [23-21].

بنابراین جذب بالا نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر می باشد. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های 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 عصاره ها ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره ها نیز افزایش یافت. مقادیر IC₅₀ محاسبه شده برای عصاره های کلاله، گلبرگ، 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 عصاره های 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 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 استفاده شد، بسته به روش سنجش بکار برده شده عصاره-های گیاهی توانایی آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان‌ها با ساختار و اعمال متفاوت می‌باشند، واضح است که تنها یک روش نمی‌تواند پیش‌بینی جامعی

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 خصوصیات مانند نوع سوبسترا، شرایط واکنش، روش‌های کمی کردن داده‌ها باشد [27]. اما در هر دو روش کلالة 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 کلالة، کورم و برگ زعفران با روش مهار رادیکال DPPH انجام شد، به ترتیب کلالة با مقدار $IC_{50} (207 \mu g \text{ ml}^{-1})$ بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پس از آن به ترتیب کورم ($246 \mu g \text{ ml}^{-1}$) و برگ ($482 \mu g \text{ ml}^{-1}$) قرار گرفتند [19] که با نتایج حاصل از این مطالعه که به ترتیب کلالة، گلبرگ، برگ و کورم قرار گرفتند متفاوت می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر با مقادیر $IC_{50} (593 \mu g \text{ ml}^{-1})$ و ($544 \mu g \text{ ml}^{-1}$) به ترتیب در دو روش DPPH و بتاکاروتن لینوئیک 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

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 کلالة 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 کلالة 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 کلالة 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 کلالة، گلبرگ، برگ و کورم به طور همزمان انجام پذیرفت، که نتایج حاکی از وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف زعفران به خصوص کلالة می‌باشد. البته در این مطالعه تنها ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کلالة زعفران مورد ارزیابی قرار گرفت و ترکیبات دیگر اصلی کلالة 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

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

5- نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشان داده شد که در بین اندام‌های مختلف زعفران، عصاره متانولی کلاله اثرات آنتی اکسیدانی قوی‌تر و میزان فنل و فلاونوئید بیشتری نسبت به اندام‌های گلبرگ، برگ و کورم دارد. اگرچه خصوصیت آنتی اکسیدانی کلاله زعفران که به عنوان ادویه مورد استفاده قرار می‌گیرد حایز اهمیت می‌باشد، اما در این مطالعه، مقایسه خواص آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی قابل توجهی می‌باشند. همان‌طور که الگوی خواص آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی دیگر اندام‌ها علاوه بر کلاله، این بخش‌ها نیز می‌توانند به عنوان منابع آنتی اکسیدانی 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-Bouraoui, 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 annuum* 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).