زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره ۸، شماره۳، پاییز ۱۳۹۶

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

سمیه تاجیک[۱]، فاطمه زرین کمر[۲*]، وحید نیکنام[۳]

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

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

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

* تهران، صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵

zarinkamar@modares.ac.ir

چکیده- در سال‌های اخیر تمایل برای استفاده از منابع گیاهی به علت نقش ترکیبات فیتوشیمیایی و کسیدان‌ها 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 فلاونوییدی 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 (۸۰ درصد) استخراج شد، سپس میزان ترکیبات فنولی و فلاونویید 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 لینولئیک اسید اندازه‌گیری شد. بر طبق نتایج، بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل (۶/۴۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) و فلاونویید کل (۱/۳۳ میلی‌گرم روتین در گرم ماده خشک) در کلاله نسبت به دیگر اندام‌ها مشاهده شد. همچنین نتایج هر دو آزمون DPPH و بتاکاروتن لینولئیک 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.

کلیدواژگان: آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولیک، فلاونویید، زعفران، DPPH.

۱- مقدمه

موجودات زنده شبکه آنتی اکسیدان پیچیده‌ای را برای خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن که برای زندگی انسان مضر هستند، ایجاد کرده‌اند. آنتی‌اکسیدان‌ها از سیستم‌های بیولوژیک نظیر پروتئین، آمینواسید، لیپید و DNA، در مقابل صدمات اکسیداتیو تولید شده به‌وسیله گونه‌های

اکسیژن بازفعال (ROS) حمایت می‌کنند و منجر به کاهش آسیب و یا مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی- عروقی وسرطان‌ها می‌شوند [۱].

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 آنتی اکسیدان‌ها به دلیل تأثیرات جانبی منفی بر سلامتی به میزان زیادی محدود شده است [۲]. لذا در سال‌های اخیر، تحقیق برای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جدیدتر، خصوصاً با منشا گیاهی به علت اهمیت چنین مولکول‌هایی در فارماکولوژی، صنایع آرایشی و غذایی افزایش یافته است [۳]. گیاهان منابع غنی از فیتوکمیکال، پروتئین‌ها، آنزیمها و دیگر محصولات با ارزش بیوتکنولوژیکی بالا می‌باشند [٤].

در همین راستا و درجهت جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات میوه‌ها، سبزیجات، ادویه‌ها، برگ‌ها، ریشه و پوست درختان به عنوان منابع بالقوه آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی استخراج شده‌اند [۲] ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی که انتشار وسیعی در گیاهان دارند از جمله‌ی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند، آنها همچنین خصوصیات ضد جهشی و ضد سرطانی، حفاظت کننده قلبی و فعالیت ضد التهابی و ضد میکروبی دارند [۵]. 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 گرانترین 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 [٦]. از گذشته به‌دلیل فعالیت‌های ضد اسپاسم و مسکن شناخته شده است و به عنوان محرک معده نیز استفاده می‌شده است. طی دهه اخیر تحقیقات بر روی خصوصیات ضد سرطان و ظرفیت سمیت‌زدایی زعفران، متمرکز شده است [۷]. اما نکتهٔ قابل ذکر آن است که عمده‌ی این مطالعات به اثرات دارویی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مؤثره کاروتنوییدی موجود در کلاله‌ی زعفران عمدتا کروسین (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 ۳۵۰ کیلوگرم گلبرگ، ۱۵۰۰ 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 [۳]. به طور کلی گلبرگ، برگ و کورم تشکیل منبعی از ترکیبات زیست فعال را با فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف و کاربردهای احتمالی می‌دهند [۳]، گلبرگ‌های زعفران دارای انواع زیادی از ترکیبات فلاوونوئیدی، گلیکوزیدی و آنتوسیانین‌ها می‌باشند [۸]. در مطالعات متعدد نیز به تأثیرات ضد افسردگی، ضد التهابی، آنتی‌تیروزینازی و آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران اشاره شده است [۹،۱۰]. از طرفی ارتباط معنی‌دار بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی با محتویات ترکیبات فنولیک آنها به اثبات رسیده است. به همین منظور مطالعات مختلفی به‌منظور 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 [۱۰]. 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 [۱۱،۱۲].

اگرچه تاکنون مطالعاتی بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی 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 فلاونوییدی کل) و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی همزمان اندام‌های کلاله، گلبرگ، برگ و کورم انجام نشده است که در این مطالعه مورد بررسی و ارزیابی قرار خواهند گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

کورم‌های گیاه زعفران *Crocus sativus* L. در تیرماه سال ۹۲ 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 ۱۰/۳۵)، کورم‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد دارای ۵ درصد کلر فعال ضد عفونی سطحی و با آب مقطر آبکشی شدند و در گلدان‌هایی به قطر ۱۵ و عمق ۱۳ در بستر پرلیت کاشته و در اواخر شهریور آبیاری شدند. پس از جوانه‌زنی در مهرماه آبیاری گلدان‌ها با محلول هوگلند ۱/۲ هرهفته دو بار و به مقدار ۱۰۰ 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 ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت خشک، سپس آسیاب گردیدند.

۲-۱- تهیه عصاره جهت مطالعات بیوشیمیایی

۰/۱ گرم از پودر نمونه‌ها توسط ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در حمام آب گرم به مدت ۳ ساعت با دمای ۷۰ درجه عصاره‌گیری شد. سپس مخلوط حاضر در g ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی توسط کاغذ صافی فیلتر و برای انجام مطالعات بیوشمیایی استفاده شد [۱۳].

۲-۲- سنجش فنل تام

محتوی فنول کل بااستفاده از معرف فولین- سیوکالتیو توسط دستگاه اسپکتروفتومتراندازه‌گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی ۲/۵ میلی‌لیتر معرف ده درصد فولین اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه گردید. پس از۹۰ دقیقه جذب هر نمونه درطول موج ۷٦۵ 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 [۱٤].

۲-۳- سنجش فلاونوئید تام

فلاونوئیدهای کل با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد. به۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار اضافه نموده، بعد از ۵ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ در صد به محلول اضافه شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ و ۲/۸ میلی‌لیتر آب دیونایز به محلول اضافه گردید.پس از ۳۰ دقیقه شدت جذب محلول در طول موج ٤۱۵ 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 [۱۵].

۲-۳- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۲-۳-۱- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با روش پاکسازی رادیکال DPPH

DPPH یا ۲ -diphenyl (۱,۱-picryl-hydrazyl) یک

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 ۵۱۷ نانومتر دارای جذب خوبی می‌باشد 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 ۵۱۷ نانومتر، بیانی از فعالیت نمونه آنتی‌اکسیدان خواهد بود [۱٦]. برای ارزیابی فعالیت پاکسازی عصاره‌ها، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۰۰٤ گرم DPPH را به ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ٤۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های گیاه اضافه نموده و جذب آن پس از ۳۰ دقیقه در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد [۱۷]. درصد مهار یا احیای DPPH توسط ترکیب آنتی اکسیدان از رابطه (۱) قابل محاسبه است:

$$AA\% = \left[\frac{A0 - A1}{A0}\right] \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

در رابطه‌ی (۱)، A0 جذب کنترل منفی است، جذب عصاره A1/ASc می‌باشد. اساس اطلاعات حاصل، IC50 عصاره (غلظتی از سوبسترا بر حسب میکروگرم بر میلی-لیتر که برای احیای رادیکال DPPH به میزان ۵۰٪ 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.

۲-۳-۲- سنجش خصوصیت آنتی‌اکسیدانی به روش بتاکاروتن لینولئیک اسید

این روش با اندکی تغییر از روش Gursoy و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شده است، ۰/۵ میلی‌گرم بتاکاروتن در ۱ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد [۱۸]، سپس ۲۵ میکرولیتر لینولئیک اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم tween 80 برای تهیه محلول استوک تهیه شد، سپس حلال به‌وسیله روتاری تبخیر شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اکسیژن‌دار همراه با تکان شدید به استوک اضافه شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش به لوله‌های مورد آزمایش حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اضافه شد و مخلوط در ۵۰ درجه در بن‌ماری انکوبه شد و جذب در ٤۹۰ نانومتر در فواصل زمانی هر ۱۵ دقیقه به مدت ۲ ساعت خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از فرمول (۲) محاسبه شد.

$$AA\% = ۱۰۰\left[۱ - \frac{(A0 - At)}{(A°۰ - A°t)}\right] \qquad (۲)$$

در رابطه (۲)، A°0 و A 0 به ترتیب، جذب نمونه و کنترل در زمان شروع و A°t و At جذب نمونه و کنترل بعد از گذشت زمان ۲ ساعت می‌باشد. نمونه کنترل به جای عصاره‌ی گیاهی حاوی متانول بود.

٤-۲- 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 ۵ درصد انجام شد.

۳- نتایج

۱-۳- سنجش ترکیبات فنولی و فلاونوییدی کل

مقایسه میانگین داده‌های فنل کل و فلاونویید کل عصاره گیاه حاکی از تفاوت معنی‌دار این ترکیبات در اندام‌های مختلف می‌باشد. همان‌طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد کلاله با میزان (٦/٤۳ mg g $^{-1}$DW) دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی می‌باشد و بعد از آن به ترتیب گلبرگ (٤/۳۵ mg g $^{-1}$DW)، کورم (۱/٤۹ mg g^{-1} DW)، و برگ

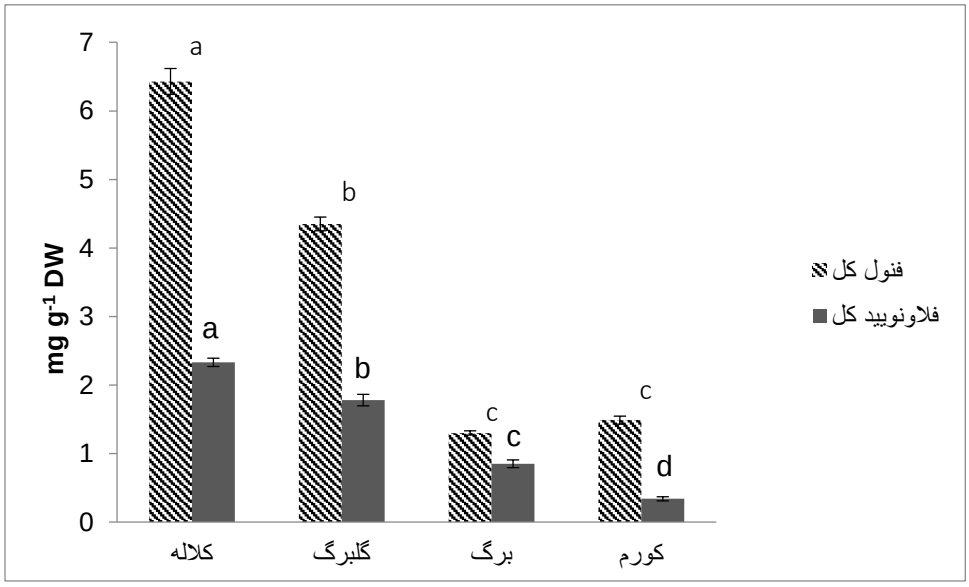
(۱/۳mg g^{-1} DW) می‌باشند. نتایج حاصل از سنجش محتوای فلاونوئید عصاره‌ها نیز بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم نشان داد کلاله بالاترین محتوای فلاونوییدی را دارا بود (۲/۳۳mg g^{-1} DW) و بعد از آن به ترتیب گلبرگ، برگ و کورم با مقادیر (mg g^{-1} DW ۰/۳٤، ۰/۸۵، ۱/۷۸) قرار گرفتند (شکل ۱، جدول ۱).

۲-۳- سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

گیاهان برای بقا در مقابل تغییرات محیط اکسیداتیو اطرافشان، از طیف متنوعی از مولکول‌ها با ساختارها و 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 [۱۹]، در مطالعه حاضر از دو روش به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH و سیستم بتا کاروتن لینولیئک اسید استفاده شده است.

۳-۳- فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH

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



شکل ۱ مقایسه ترکیبات فنولی و فلاونوییدی کل در اندام‌های مختلف زعفران ***Crocus sativus***

جدول ۱ میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره اندام‌های مختلف ***Crocus sativus***

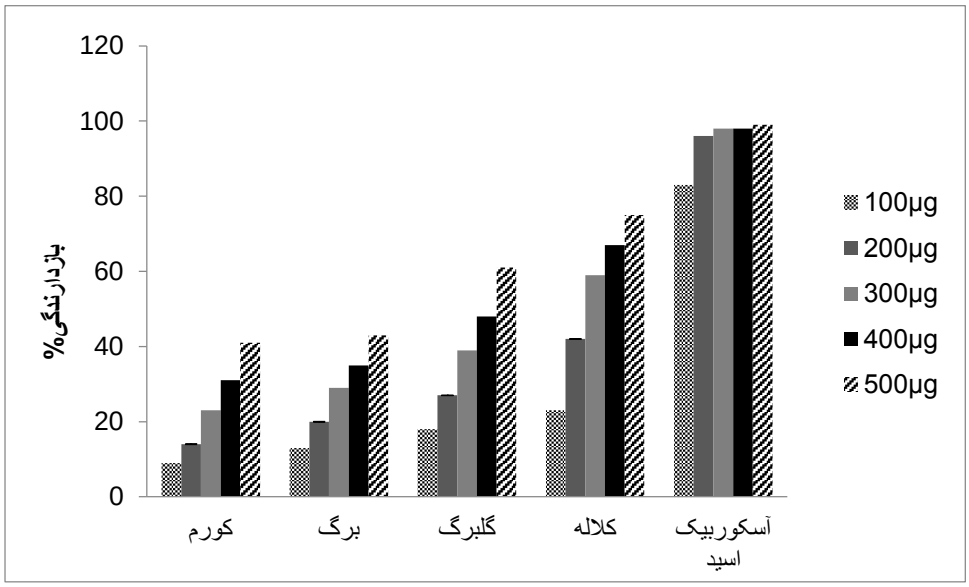
اندام	فنول کل (میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره)	فلاونویید کل (میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره)
کلاله	٦/٤۳±۰/۱۹	۲/۳۳±۰/۰٦
گلبرگ	٤/۳۵±۰/۱	۱/۷۸±۰/۰۸
برگ	۱/۳±۰/۰۳	۰/۸۵±۰/۰۵
کورم	۱/٤۹±۰/۰۵	۰/۳٤±۰/۰۳

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.

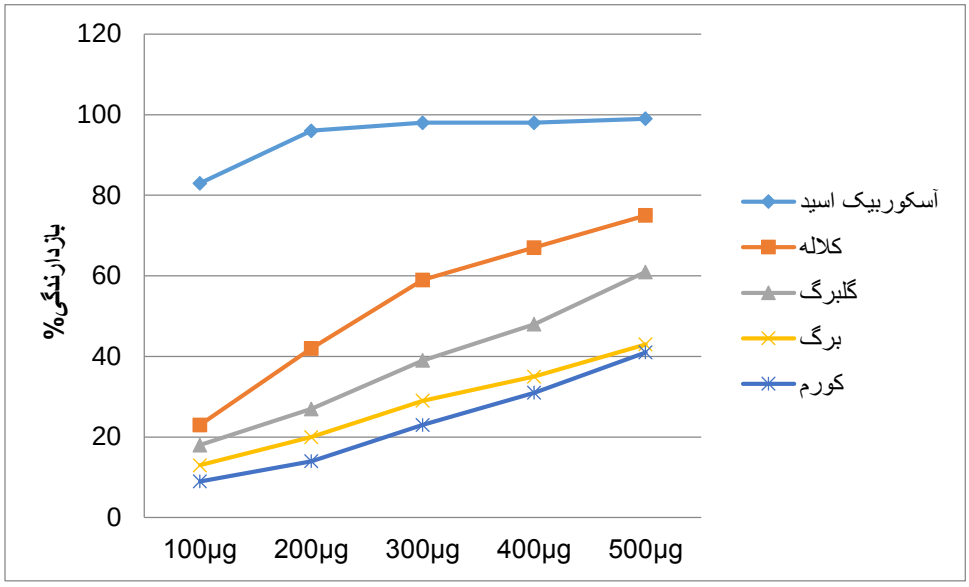
در شکل ۲ میزان بازدارندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی اندام‌های مختلف کلاله، گلبرگ، برگ و کورم در برابراسید آسکوربیک به‌عنوان شاهد ارائه شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، عصاره‌ی اندام‌های مختلف توانایی آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را نشان می‌دهند. در این بین، کلاله نسبت به اندام‌های گلبرگ، برگ و کورم دارای بیشترین درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد بود (درصد بازدارندگی ۷۵٪ در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). فعالیت آنتی‌اکسیدانی همه‌ی عصاره‌ها وابسته به غلظت می‌باشد و با افزایش غلظت عصاره این خاصیت نیز افزایش می‌یابد (شکل ۲). مقادیر IC50 برای عصاره‌های کلاله، گلبرگ، برگ و کورم به ترتیب، ۲۷۵، ٤۰٦، ۵۹۳ و ٦۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. البته ظرفیت آنتی‌اکسیدانی همه‌ی عصاره‌ها از آسکوربیک اسید که به عنوان استاندارد در نظر گرفته شده است، کمتر می‌باشد (IC50:۱۰/۱۷) (شکل ۳).

٤-۳- سنجش آنتی‌اکسیدانی به روش بتا کاروتن لینولیئک 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-لینولیئک 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 غیراشباع حمله می‌کنند و در این فرایند باندهای غیراشباع بتاکاروتن از دست می‌رود و رنگ نارنجی بتاکاروتن ناپدید می‌شود. در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون آن توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌شود و رنگ نارنجی حفظ می‌شود [۳].



شکل ۲ فعالیت آنتی رادیکالی عصاره متانولی اندام‌های زعفران در مقایسه با اسید آسکوربیک در روش DPPH



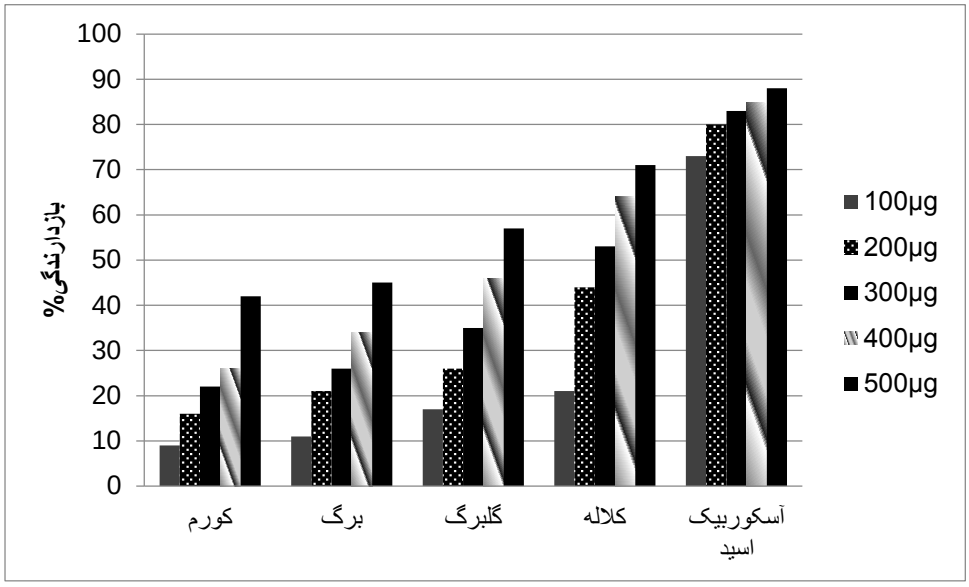
شکل ۳ منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری عصاره های اندامهای مختلف در مقابل ASc در روش DPPH

بنابراین جذب بالا نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌باشد. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اندام‌های مختلف با روش رنگبری بتاکاروتن نیز نتایج حاصل از بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH را تأیید کرد و کلاله (با درصد بازدارندگی ۷۱٪ در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به دیگر اندام‌ها نشان داد (شکل ٤). در این روش نیز با افزایش غلظت عصاره‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیزافزایش یافت. مقادیر IC۵۰ محاسبه شده برای عصاره‌های کلاله، گلبرگ، برگ و کورم به ترتیب (۲۵۱، ٤۵۰، ٥٤٤ و ۵۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. آسکوربیک اسید نیز که به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد در این مدل استفاده شد با IC50:۱۳/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به عصاره‌های اندام‌های مختلف بود (شکل ۵). البته کلاله در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۷۱٪ با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید که دارای فعالیت آنتی‌رادیکالی ۷۳٪ است تقریباً قابل مقایسه می‌باشد.

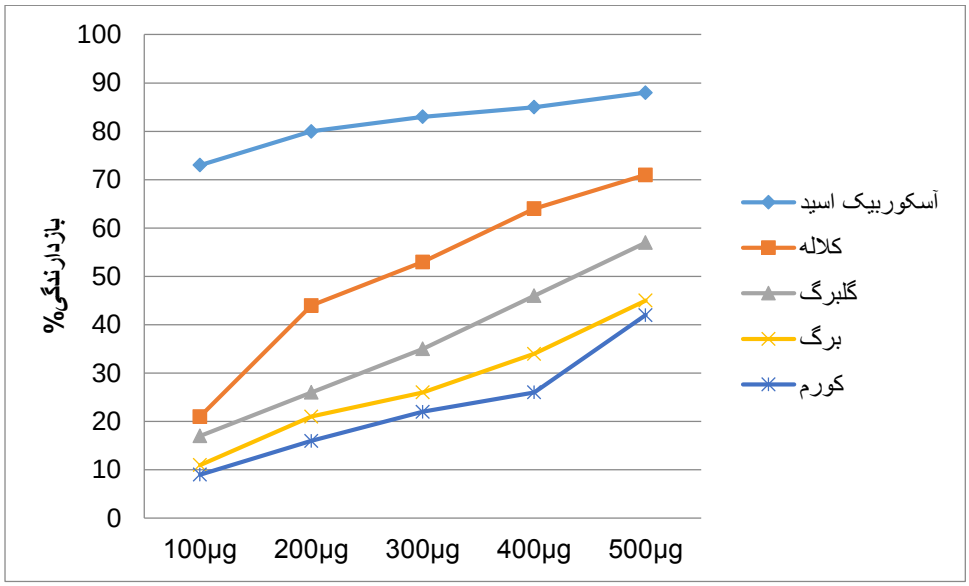
٤- بحث

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 نمی تواند پیش بینی جامعی از تأثیر تمام پارامترهای درگیر در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ارائه دهد [۱۹]، بنابراین در مطالعه‌ی حاضر از دو روش مختلف DPPH و بتاکاروتن برای ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اندام‌های مختلف در زعفران استفاده شد [۲۰،۲٦].

مطالعه میزان ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف زعفران وجود اختلاف معنی‌دار را در محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، همچنین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف را نشان داد. بر طبق جدول ۱، کلاله دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد. محتوای پلی فنولها در گیاهان به عوامل مختلفی بستگی دارد و بسته به عملگرد گونه، واریته،اندام و مرحله‌ی فیزیولوژیک می‌تواند متفاوت باشد [۲۱-۲۳].



شکل ٤ درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید عصاره متانولی اندام‌های مختلف درروش بتاکاروتن- لینولئیک اسید



شکل ٥ منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری عصاره‌های اندام‌های مختلف در مقابل ASc در روش بتاکاروتن-لینولئیک اسید

همچنین در مطالعات دیگر نیز به پراکنش متفاوت متابولیت‌های ثانویه بسته به اندام اشاره شده است [۲۳-۲۵]. 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 از تأثیر تمام پارامترهای درگیر در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ارائه دهد [۱۹]، 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-

دهند [۲٦]. 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 ۳ و ۵)، که این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل اختلاف در خصوصیاتی مانند نوع سوبسترا، شرایط واکنش، روش‌های کمی کردن داده‌ها باشد [۲۷]، اما در هر دو روش کلاله دارای بالاترین خصوصیت آنتی‌اکسیدانی و بعد از آن به ترتیب گلبرگ، برگ و کورم قرار دارند (شکل‌های ۲ و٤). تنوع فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط با اندام درهالوفیت‌ها گزارش شده است [۲۸]. چنین روندی نیز برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف گونه Salvia نیز بیان شده است [۲۹]. 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 [۱۵]. در این مطالعات به رابطه‌ی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی و حضور ترکیبات فیتوشیمیایی همچون آنتوسیانین‌ها، فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها و تانن‌ها اشاره شده است [۲]. 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 IC50(۲۰۷ $\mu g\ ml^{-1}$) بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پس از آن به ترتیب کورم (۲٤٦ $\mu g\ ml^{-1}$) و برگ (٤۸۲$\mu g\ ml^{-1}$) قرار گرفتند [۱۹] که با نتایج حاصل از این مطالعه که به ترتیب کلاله، گلبرگ، برگ و کورم قرار گرفتند متفاوت می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر با مقادیر IC50(۵۹۳ $\mu g\ ml^{-1}$) و (٥٤٤ $\mu g\ ml^{-1}$) به ترتیب در دو روش DPPH و بتاکاروتن لینولئیک 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 [٤]. 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 [۳۰].

دراین مطالعه توانایی بالای آنتی‌اکسیدانی کلاله نسبت به دیگر اندام‌ها می‌تواند به دلیل میزان بالای ترکیبات فنولی و فلاونوییدی در این اندام نسبت به دیگر قسمت‌ها باشد (شکل ۱). 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 فلاونوییدی توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان می‌دهند [۳۱]. در پژوهشی دیگر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله‌ی زعفران حتی بالاتر از گیاهان گوچه فرنگی و هویج گزارش شده است [۷].

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 فلاونوییدی کلاله‌ی زعفران مورد ارزیابی قرار گرفت و ترکیبات دیگر اصلی کلاله شامل کاروتنویید 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

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 سینرژیسم ترکیبات فعال موجود در آن باشد که نباید مورد چشم پوشی قرار گیرند [۳٦-۳٤].

۵- 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.

٦- 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 Zatariamultiflora Boiss. Food Control 18: 800-805.

[2] Naczk, 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. 166–169.

[3] Sanchez-Vioquea, b. R., Rodreguez-Condea M., Reina-Ure˜naa J., Escolano-Terceroa M., Herraiz-Pe˜nalvera D. Santana-Méridasa, b (2012). In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). ndustrial 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). Antinocicetive 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

[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.

[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 maturitystage. 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 ediblemedicinal 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).

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). 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.