مقاله پژوهشی

پرچم و کلاله برخی گونه‌های زعفران وحشی (*Crocus sp.*) به عنوان منبع غنی آنتی اکسیدان‌ها

فاطمه شاهین فر[۱]، سارا تقی خواه خمامی[۱]، سیده فاطمه فلاح[۲]، منصور افشارمحمدیان[۱]*، داوود بخشی[۳]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران، [۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران، [۳] گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۹/۱۱)

چکیده

زعفران (*Crocus sp.*) به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد و به عنوان طعم دهنده و مواد طبیعی رنگ آمیزی استفاده می‌شود. ارزیابی مقایسه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پرچم و همچنین ترکیب مؤثره و دارویی کروسین در کلاله و پرچم گونه زعفران زراعی در مقایسه با گونه‌های بومی وحشی زیبا و خزری جمع آوری شده از استان گیلان، اهداف اصلی این مطالعه بود. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان ترکیب مؤثره کروسین در کلاله گونه زیبا (*C. speciosus*) و خزری با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گونه زراعی (*C. sativus*) بود، ولی میزان رنگیزه کروسین در پرچم گونه زراعی (*C. sativus*) با اختلاف معنی داری بیشتر از گونه زیبا (*C. speciosus*) و خزری (*C. caspius*) بود. همچنین نتایج بررسی‌ها در تحقیق حاضر نشان‌داد که میزان فنل کل و همچنین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) در پرچم گونه زراعی (*C. sativus*) به صورت معنی داری بیشتر از دو گونه زیبا (*C. speciosus*) و خزری (*C. caspius*) بود، ولی میزان فلاونل در دو گونه زیبا (*C. speciosus*) و خزری (*C. caspius*) به صورت معنی داری بیشتر از گونه زراعی (*C. sativus*) بود. با توجه به اینکه تاکنون، پرچم زعفران زراعی به عنوان بخش دور ریز زعفران محسوب می‌شد، بر اساس نتایج این تحقیق، به علت سطح بالای فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیب دارویی کروسین در پرچم زعفران زراعی و وحشی، علاوه بر کلاله، این بخش زعفران زراعی و وحشی نیز پتانسیل قابل توجهی به عنوان منبع غنی آنتی اکسیدانی، جهت غنی کردن سبد غذایی مردم و استفاده در انواع برنامه‌های دارویی و غذایی دارد.

کلیدواژه: زعفران وحشی، زعفران زراعی، کروسین، پرچم، کلاله

مقدمه

زعفران، در واقع کلاله خشک شده گل‌های زعفران، جزء ادویه‌های با ارزش‌تر دنیا است (Horozić, 2020). گل‌های زعفران دارای کلاله سه شاخه قرمز-نارنجی است و به طور گسترده در ایران و سایر کشورها مانند هند، یونان، اسپانیا، ایتالیا کشت می‌شود (Mykhailenko *et al*., 2019). ایران بزرگترین تولید کننده زعفران در جهان و چین بزرگترین وارد کننده زعفران از ایران می‌باشند (Liu *et al*., 2016). استان خراسان به عنوان مهمترین منطقه تولید زعفران در ایران شناخته می‌شود و ۹۲٪ کل تولید زعفران در سطح کشور و ۹۸٪ مناطق

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: afshar@guilan.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]

زیر کشت ایران به این استان تعلق دارد (Kafi *et al*., 2002).

یکی از اجزای اصلی عصاره زعفران کروسین است که یک کاروتنوئید محلول در آب است. تحقیقات گسترده‌ای در مورد کروسین نشان می‌دهد که کروسین دارای فعالیت حذف رادیکال آزاد قوی و اثرات دارویی متعددی از جمله فعالیت‌های ضد سرطانی و هیپولیپیدمی است. البته اثرات درمانی زعفران بیشتر به فعالیت‌های پالایشی ترکیبات آن در حذف رادیکال‌های آزاد نسبت داده شده است (Bukhari *et al*., 2018). یعنی بر اساس گزارش‌های موجود، فعالیت آنتی اکسیدانی زعفران و ترکیبات فعال زیستی آن بیشتر مسئول اثرات دارویی مختلف آن باشند. از آنجایی که رادیکال‌های آزاد در بیماری‌های مختلف انسانی مانند سکته مغزی، نارسایی قلبی، پارکینسون، آلزایمر و سرطان نقش دارند. آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند تنش اکسیداتیو را به تأخیر بیاندازند و یا مهار کنند، بنابراین می‌توانند در پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از آسیب اکسیداتیو کمک کنند (Hosseinzadeh *et al*., 2009). علاوه بر این، پیکروکروسین موجود در زعفران به عنوان یک ماده افزودنی، طعم مطبوعی به غذا می‌دهد. پیکروکروسین در واقع پیش ساز گلیکوزیلی شده سافرانال است. سافرانال زعفران نیز که عامل اصلی ایجاد عطر و بوی زعفران می‌باشد، یک مونوترپن آلدئید است که از پیکروکروسین در نتیجه هیدرولیز آنزیمی یا شیمیایی به وجود می‌آید (Narasimhan, 1992).

علاوه بر کروسین، ترکیبات فنلی در گل پوش، برگ و کلاله گونه‌های زعفران فعالیت مهار رادیکال آزاد داخل سلولی را نشان می‌دهند و از سلول‌ها و بافت‌ها در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند (Mykhailenko *et al*. 2019). تحقیقات نشان می‌دهد که به طور کلی عصاره‌های طبیعی گیاهان دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی قوی هستند و می‌توانند به عنوان منبع غنی آنتی اکسیدانی در حوزه سلامت جوامع انسانی نیز مورد استفاده قرار گیرند (Zhang *et al*., 2019). ترکیبات فنلی به همراه سایر آنتی اکسیدان‌ها از قبیل فلاونوئیدها، با جمع آوری رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، به عنوان ترکیبات دارویی، نقش مهمی در سلامتی انسان و کاهش بیماری‌های قلبی عروقی دارند (Falleh *et al*. 2012). ترکیبات فنلی از مهمترین آنتی اکسیدان‌های طبیعی و محصولات متابولیکی ثانویه، نه تنها در فرآیند رشد و نمو سلول‌های گیاهی، بلکه در پاسخ‌های فیزیولوژیکی و اکولوژیکی گیاهان نیز نقش‌های مهمی دارند (Baba, 2015). مطالعات Anjum و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که حضور فلاونوئیدهایی مانند روتین، کوئرستین، لوتئولین، هسپریدین، بیوفلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها در گلبرگ گل‌ها می‌توانند اثرات ضد درد و ضد التهاب و کاهنده فشار خون داشته باشند.

کیفیت زعفران شامل رنگ، عطر و طعم آن عمدتاً به منطقه جغرافیایی که در آن تولید می‌شود، شرایط آب و هوایی و خاک، سیستم‌های مختلف فرآوری و ذخیره آن بستگی دارد (Liu *et al*., 2016). گزارش‌ها نشان می‌دهد که عصاره متانلی کلاله گل زعفران، حاوی طیف گسترده‌ای از آنتی اکسیدان‌ها، بخصوص ترکیبات فنلی است که اگر به درستی جدا شود، می‌تواند به طور قابل توجهی در صنایع دارویی و غذایی استفاده شوند (Sariri *et al*., 2011; Afshar-Mohammadian *et al*., 2016). علاوه بر این، پرچم، گلبرگ و کاسبرگ از محصولات فرعی محصول زعفران هستند که علیرغم وجود ترکیبات مؤثره، از جمله انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در بخش‌های مذکور، تقریباً هیچ استفاده‌ای از آن‌ها در ایران صورت نمی‌گیرد (Rouhani *et al*., 2015; Kordi and Afshar-Mohammadian, 2019).

با توجه به ارزش قابل توجه اقتصادی، خواص دارویی و مصرف غذایی زعفران، هدف تحقیق حاضر، ارزیابی مقایسه‌ای میزان کروسین در کلاله و پرچم سه گونه زعفران خزری (*C. caspius*)، زیبا (*C. speciosus*) و زراعی (*C. sativus*) جمع‌آوری شده در استان گیلان و همچنین ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی در پرچم گونه‌های مذکور بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها: گلهای دو گونه زعفران خزری (*C. caspius*) و زیبا (*C. speciosus*) مورد مطالعه از ارتفاع ۱۱۰

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]

متری رستم آباد واقع در استان گیلان وگونه زراعی (*C. sativus*) از مزرعه‌ای واقع در روستای نفوت در سه کیلومتری شهرستان صومعه سرا در استان گیلان جمع آوری شدند. سپس کلاله و پرچم‌ها را از بقیه اجزای گل جدا کرده و در دمای اتاق (۲۶~) خشک شد و سپس در دمای ٤ درجه سانتی گراد (در یخچال) نگهداری شدند.

سنجش میزان کروسین کلاله: اندازه گیری ترکیب کروسین موجود در کلاله گونه‌های مختلف زعفران با استفاده از دستگاه HPLC مدل SHIMADZU با آشکارساز UV-visible، RF10AXL ستون مجهز به (C18:250mm-4mm) صورت گرفت. برای سنجش میزان کروسین، ابتدا در هاون، کلاله‌ها را به صورت پودر در آورده و مقدار ۰/۲ گرم از پودر کلاله‌ها را به تفکیک به میکروتیوب ها انتقال داده و پس از آن به هر یک از میکروتیوب ها ۲ میلی لیتر حلال استخراج شامل ۸۰٪ متانول، ۵٪ استیک اسید و ۱۵٪ آب دیونیزه اضافه شده و به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد روی استیرر قرار داده تا ترکیبات موجود در کلاله‌های زعفران خارج شوند. سپس مایع رویی با سمپلر برداشته شد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی را از فیلتر نایلونی سرسوزنی عبور داده تا عصاره‌ها جهت تزریق به دستگاه HPLC خالص باشند. آنالیزHPLC روی یک سیستم انتقال دوحلاله انجام شد. از یک ستون C18 برای آنالیز استفاده شد و یک نسبت ۱۵/۷۵ از آب و متانول (۱۵ درصد استونیتریل) به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۱ میلی لیتردر دقیقه با زمان ۲۵ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد. جهت مشاهده پیک مربوط به کروسین، ۲۰ میکرولیتر از عصاره کلاله گونه‌های خزری، زیبا و زراعی زعفران به دستگاه HPLC تزریق شد (Bakhshi & Arakawa, 2006).

سنجش میزان کروسین پرچم: برای استخراج ترکیب کروسین از پرچم گونه‌های مختلف زعفران، ابتدا پرچم خشک شده زعفران را به صورت پودر در آورده و سپس با استفاده از دستگاه سوکسله و با حلال متانل، عمل استخراج و عصاره گیری از پودر پرچم انجام شد. به این ترتیب که ابتدا پرچم گونه خزری، زیبا و زراعی زعفران که در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شده بود در هاون دستی به شکل پودر درآورده و سپس مقدار ۱ گرم از پودر پرچم را به ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال متانل اضافه کرده و با استفاده از دستگاه سوکسله، عمل استخراج به مدت ۷ ساعت انجام و عصاره بدست آمده از هر گونه در داخل ارلن ریخته شد و درب آن‌ها را با پارافیلم محکم کرده و در یخچال قرار گرفت. جهت انجام کروماتوگرافی، مقدار ۰/۵ میلی لیتر از عصاره را از فیلتر سرسوزنی عبور داده و مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن را برداشته و به دستگاه تزریق شد. مدت زمان لازم جهت مشاهده پیک هر کدام از عصاره‌ها، ۲۵ دقیقه بود (Sohei and Peyvandi, 2014).

سنجش میزان آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی: جهت سنجش محتوای فنل کل، فلاونل کل و سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH (۲ و۲ – دی فنیل پیکریل هیدرازیل) از روش Bakhshi و Arakawa (۲۰۰٦) استفاده شد. به این ترتیب، ۰/۵ گرم از نمونه خشک شده در هاون ساییده شد و به میکروتیوپ‌هایی مشخص انتقال داده شدند. سپس به هر یک از میکروتیوپ‌ها، ۱۵۰۰ میکرولیتر حلال استخراج شامل متانول–استیک اسید (نسبت ۸۵ به ۱۵) اضافه و به مدت ٢٤ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در مرحله بعد میکروتیوپ‌های حاوی نمونه به مدت ده دقیقه با سرعت (rpm) ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول شناور جدا شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به منظور آنالیز پارامترهای ذکر شده نگهداری شدند.

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی: فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از سنجش پاک سازی رادیکال آزاد DPPH (۲ و ۲-دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل) بر اساس اتم‌های هیدروژن یا توانایی دهندگی الکترون عصاره با حذف رنگ ارغوانی محلول متانلی با استفاده از روشSarikurkcu و همکاران (۲۰۰۸) ارزیابی شد. برای این منظور، ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره ۱۰۰ برابر رقیق شده، ٤۰۰۰ میکرولیتر محلول متانلی ۰/۰۰٤ درصد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]

DPPH اضافه شد. کنترل و بلانک نیز به ترتیب با ۱ میلی لیتر محلول متانلی ۰/۰۰٤ درصد DPPH و ۱ میلی لیتر حلال استخراج آماده شد. سپس میکروتیوپ‌ها به خوبی تکان داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه تاریک در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس جذب کنترل و نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\%DPPHsc= (A_{cont-} A_{samp})/ A_{cont *}100$$

%DPPHsc = درصد بازدارندگی، A_{cont}= میزان جذب DPPH و A_{samp}= میزان جذب (نمونه + DPPH)

سنجش مقدار فنل و فلاونل کل: سنجش میزان فنل کل بر اساس روش Slinkard و Singleton (۱۹۷۷) انجام شد. به این ترتیب که ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره ۳۰ برابر رقیق شده، ۳۷۵ میکرو لیتر آب مقطر، ۲/۵ میلی لیتر فولین ۱۰٪ و پس از ٦ دقیقه ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ در تاریکی اضافه شد و پس از ۱/۵ ساعت قرار گرفتن در تاریکی و دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید، میزان فنل کل برحسب میلی گرم اسید گالیک در یک گرم وزن خشک بدست آمد.

برای سنجش میزان فلاونل کل، ۱ میلی لیتر از عصاره، ۲ میلی لیتر کلرید آلومینیم ۲٪، شش میلی لیتر استات سدیم ۵٪ و ۱ میلی لیتر حلال استخراج اضافه شد. بلانک نیز به همین ترتیب با ۱ میلی لیتر حلال استخراج به جای عصاره آماده شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت و نیم قرار گرفتن در دمای اتاق در طول موج ٤٤۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Miliauskas and Venskutonis, 2004). برای رسم نمودار استاندارد از روتین به عنوان نمودار استاندارد استفاده شد. با قرار دادن جذب هر کدام از نمونه‌ها در معادله منحنی استاندارد، غلظت هر نمونه بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک بدست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده علوم و دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان اجرا شد. تجزیه آماری به کمک نرم افزار SPSS۲۳ انجام شد. تحلیل واریانس با استفاده از روش ANOVA یک طرفه انجام شد. آزمون Tukey برای مقایسه میانگین داده‌ها و برای رسم نمودارها از نرم افزار Exell 2010 استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی مقدار کروسین موجود در کلاله و پرچم: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مقدار متوسط کروسین در یک گرم زعفران در کلاله سه گونه خزری، زیبا و زراعی به ترتیب برابر با ۳۵/۸۷، ۳۵/٤۰ و ۱۵/۲۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود، به طوری که مقدار متوسط کروسین در کلاله گونه خزری و زیبا به طور معنی داری تقریباً دو برابر گونه زراعی بود (شکل ۱).

پیک به دست آمده از دستگاه HPLC جهت تعیین مقدار کروسین در کلاله سه گونه خزری، زیبا و زراعی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا که در طول موج ٤٤۰ نانومتر خوانده شدند (شکل ۲).

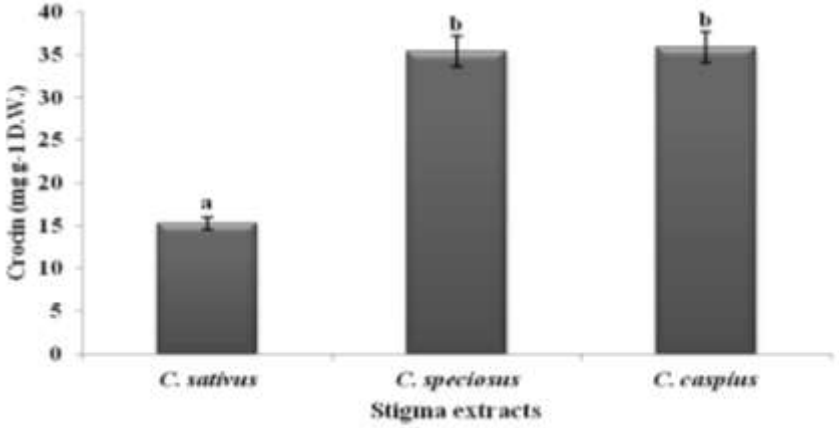
در پژوهش حاضر مقدار کروسین در سه گونه خزری، زیبا و زراعی به ترتیب برابر با ۰/۰۵، ۰/۱٦۵ و ۰/۱۱۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک بدست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد که بر خلاف مقدار کروسین موجود در کلاله زعفران خزری، میزان کروسین در پرچم گونه خزری به طور معنی داری کمتر از دو گونه زیبا و زراعی بود و تفاوت معنی داری در میزان کروسین در در پرچم دو گونه زیبا و زراعی مشاهده نشد (شکل ۳).

نتایج بررسی طیف‌های عصاره پرچم سه گونه خزری زیبا و زراعی زعفران جهت تعیین مقدار کروسین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در شکل ٤ نشان داده شده است.

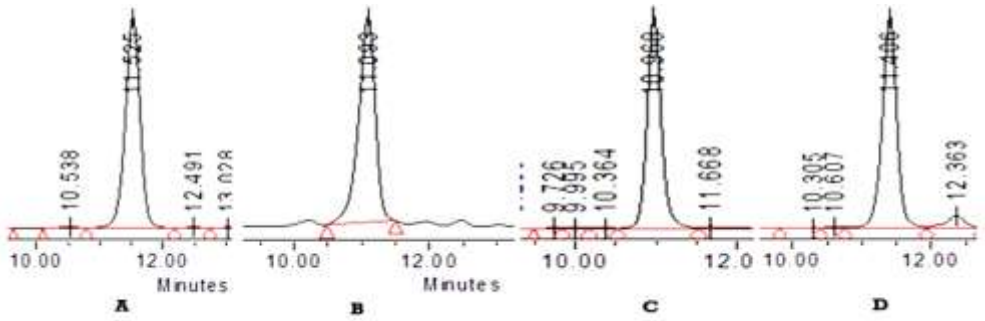
زعفران به عنوان ادویه تقریباً در سراسر جهان مورد استقبال قرار گرفته است. رنگ جذاب زعفران به دلیل وجود کروسین و طعم تلخ و بی نظیر زعفران به دلیل وجود پیکروکروسین، گلیکوزید منوتروپن است و سافرانال آگلیکون، ترکیب اصلی فرار آن، مسئول عطر زعفران است (Zeka *et al.*, 2015). این ترکیبات همراه با ترکیبات دیگر آنتی اکسیدانی از قبیل آنتوسیانین و ترکیبات فنلاونوئیدی، دارای اثرات ضد میکروبی و دارویی مختلفی بر بیماری‌های مختلف از جمله اثرات ضد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

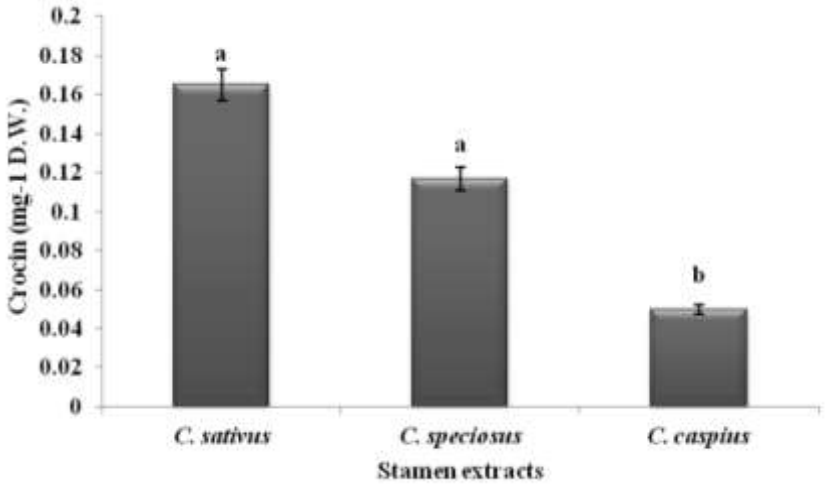
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]



شکل ۱- محتوای کروسین در کلاله سه گونه خزری، زیبا و زراعی زعفران. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد آزمون توکی هستند (P≤0.05).



شکل ۲- کروماتوگرام کروسین در کلاله سه گونه زعفران، A(گونه خزری)، B) زیبا، C) زراعی و D) کروسین استاندارد

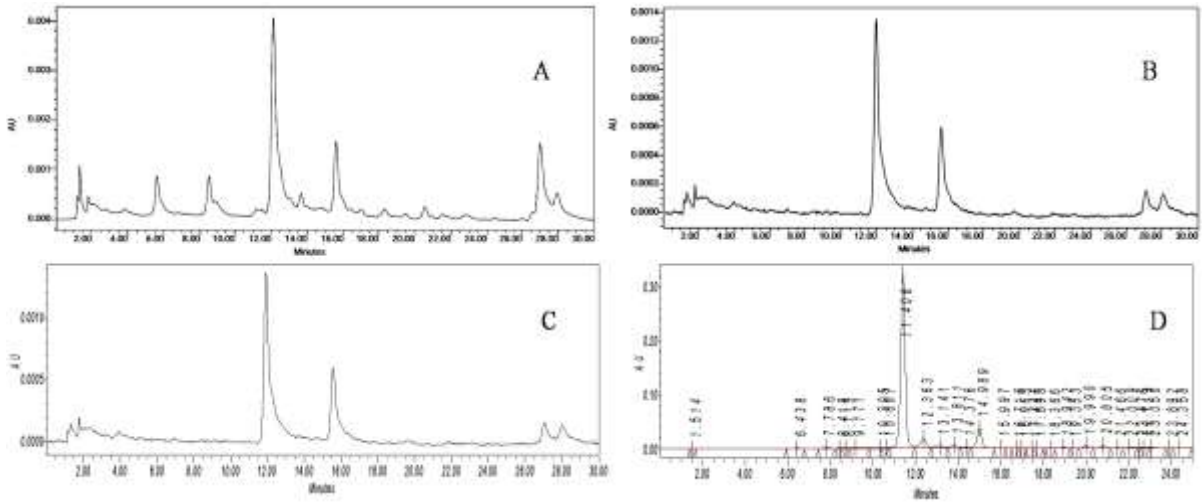


شکل ۳- محتوای کروسین در پرچم سه گونه خزری، زیبا و زراعی زعفران. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد آزمون توکی هستند (P≤0.05).

توموری با مهار رشد سلولی هستند (Aung *et al*., 2007) و کیفیت ادویه زعفران توسط این ترکیبات تعیین می‌شود (Zeka *et al*., 2015; Afshar-Mohammadian *et al*., 2016; Kordi and Afshar-Mohammadian, 2019)؛ اما نقش کروسین در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]



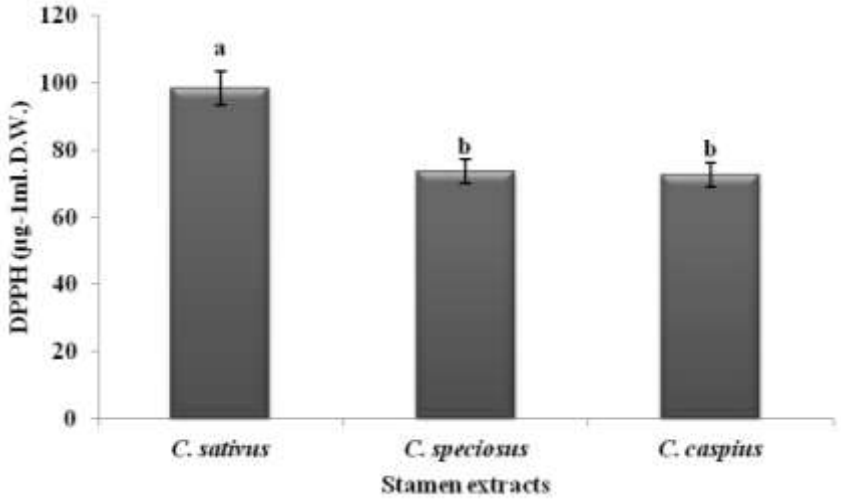
شکل ٤- کروماتوگرام کروسین در پرچم سه گونه زعفران، A) گونه خزری، B) زیبا، C) زراعی و D) کروسین استاندارد

فعالیت‌های آنتی اکسیدانی عصاره زعفران از اهمیت بیشتری برخوردار است، زیرا معمولاً میزان سافرانال در عصاره زعفران کمتر از ۱ درصد است (Hosseinzadeh *et al*., 2009).

تحقیقات نشان می‌دهد که کروسین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی می‌تواند از طریق تعدیل تنش اکسیداتیو، اثرات محافظت کننده‌ای در صورت ایجاد سمیت ناشی از مصرف ایزوپروترنول در افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی داشته باشد (Goyal *et al*., 2010). بر اساس نتایج این تحقیق، میزان ترکیب مؤثره کروسین در کلاله و پرچم گونه‌های مختلف زعفران به نسبت‌های مختلفی وجود دارد. به طوری که ترکیب مؤثره کروسین در کلاله گونه خزری و زیبا به طور معنی داری بیشتر از گونه زراعی بود (شکل ۱)، در حالی که میزان کروسین در پرچم گونه خزری به طور معنی داری کمتر از دو گونه زیبا و زراعی بود. نسبت‌های مختلف کروسین در کلاله و پرچم ممکن است به دلیل جذب دوباره و ذخیره سازی ترکیبات ضمن جلوگیری از هدر رفتن مواد مغذی باشد. به طوری که پیشنهاد شده است در کلاله‌هایی که در معرض پیری قرار گرفته‌اند، انتقال مجدد ترکیبات سلولی از اندام‌های پیر شده به سایر ساختارهایی که همچنان در حال توسعه هستند نیز رخ می‌دهد (Rubio-Moraga *et al*., 2010).

ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی: فعالیت پالایشی رادیکال‌ها توسط عصاره زعفران و ترکیبات فعال زیستی آن (کروسین) با استفاده از تست درصد بازدارندگی DPPH نشان داده شده است. روش DPPH یک روش حساس، سریع و آسان برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی یک ترکیب ویژه در عصاره گیاهی است (Pourmorad *et al*., 2006). فعالیت آنتی اکسیدانی یک ترکیب می‌تواند از طریق ممانعت از تشکیل رادیکال یا از طریق جمع آوری آن‌ها در یک سیستم تولید کننده رادیکال تعیین شود (Pennycooke *et al*., 2005). همانطور که در نتایج تحقیق حاضر مشاهده شد، درصد بازدارندگی DPPH در پرچم سه گونه خزری، زیبا و زراعی زعفران افزایش نشان دادند، اما این افزایش در درصد بازدارندگی در پرچم گونه زراعی در مقایسه با پرچم دو گونه خزری و زیبا معنی دار بود. ضمن اینکه تفاوت معنی داری در میزان درصد بازدارندگی پرچم دو گونه خزری و زیبا مشاهده نشد. به طوری که درصد بازدارندگی DPPH پرچم گونه خزری ۷۲/۲، گونه زیبا µg/ml ۷۳/۷ و گونه زراعی µg/ml ۹۸/۵ بود (شکل ۵). این در حالیست که درصد بازدارندگی DPPH در پژوهش قبلی ما در گلبرگ گونه زیبا µg/ml ٤٣/٤٧ و در گلبرگ گونه زراعی µg/ml ٤٧/٤ بدست آمد که نشان دهنده کمتر بودن درصد فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد در گلبرگ زعفران نسبت به پرچم آن است (کردی و افشارمحمدیان، ۱۳۹۷). همچنین نتایج مطالعات Goli و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که درصد بازدارندگی DPPH

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]



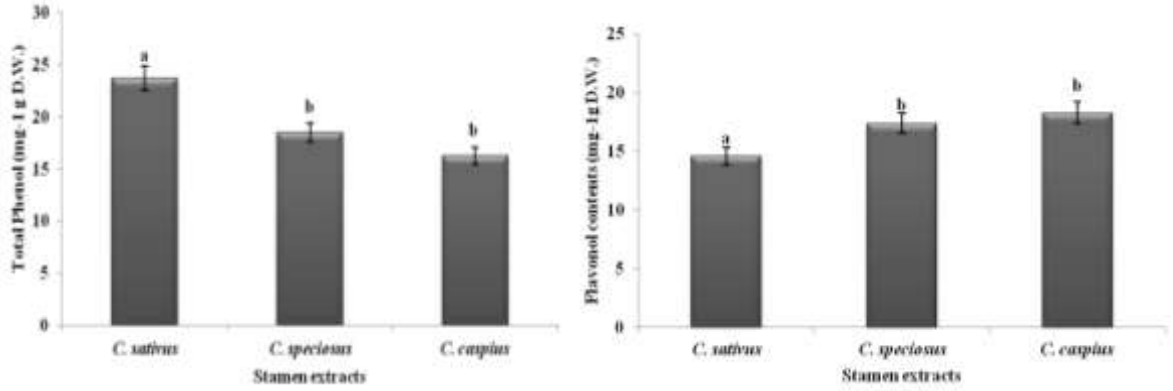
شکل ۵- میزان DPPH در پرچم سه گونه خزری، زیبا و زراعی زعفران. **حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد آزمون توکی هستند (P≤0.05)**.

گلبرگ زعفران گونه زراعی در شهرستان کشه، منطقه کارکاس، استان اصفهان ۳۹/۸۰ µg/ml بود که این مقدار کمتر از مقدار به دست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد.

علاوه بر این، Sariri و همکاران (۲۰۱۱) درصد بازدارندگی DPPH عصاره متانلی گلبرگ گونه زراعی در منطقه قائنات را ۳۲/۳۳ گزارش کردند که به میزان قابل توجهی در مقایسه با میزان اندازه گیری شده در پرچم زعفران در مطالعه حاضر پایین‌تر است. بر اساس گزارش Afraze و همکاران (2014)، در گلبرگ‌های زعفران زراعی برداشت شده از مزارع گناباد، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در غلظت ppm ۳۰۰ عصاره اتانلی ۹۲/۳۰µg/ml و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی در غلظت ppm ۱۰۰ عصاره آبی µg/ml ۱۵/۳۲ بود. در واقع اختلاف در میزان راندمان استخراج عصاره‌ها در پژوهش‌های مختلف احتمالاً به علت تفاوت در شرایط محیط کشت، منطقه جغرافیایی و زمان برداشت نمونه و همچنین شرایط استخراج عصاره به روش حلال سرد با استفاده از حلال متانل، اتانل و آب می‌باشد (Sariri *et al*., 2011). همچنین، تحقیقات Afraze و همکاران (2014) نشان داد که بالاترین میزان ترکیبات فنلی گلبرگ‌های زعفران جمع آوری شده در مزارع گناباد در غلظت ppm ۳۰۰ عصاره‌ی اتانلی (۷۰٪)، ۳٤/٦۸ و بعد در غلظت ppm ۳۰۰ عصاره متانلی (۷۰)، ۳۲/۲۱ بود. در هر دو حلال اتانل و متانل با افزایش درصد حلال‌ها (کاهش میزان آب) میزان ترکیبات فنلی آن‌ها نیز کاهش یافت.

محتوای فنل و فلاونل کل: در تحقیق حاضر، میزان فنل و فلاونل در پرچم سه گونه خزری، زیبا و زراعی زعفران جمع آوری شده در استان گیلان نیز مورد بررسی قرار گرفتند که بر اساس نتایج بدست آمده، میزان فنل کل در پرچم گونه زراعی افزایش معنی داری را در مقایسه با دو گونه زیبا و خزری نشان داد. در حالی که میزان فلاونل در پرچم دو گونه خزری و گونه زیبا در مقایسه با پرچم گونه زراعی افزایش معنی داری را نشان داد. ضمن این که میزان فنل کل و میزان فلاونل کل در دو گونه زیبا و زراعی تفاوت معنی داری را نشان ندادند (شکل ٦). در حالی که در پژوهش قبلی ما، میزان فنل در گلبرگ سه گونه زعفران خزری، زیبا و زراعی جمع آوری شده در استان گیلان مشخص شد که میزان فنل کل در گلبرگ گونه زراعی از دو گونه زیبا و خزری به صورت معنی‌داری بیشتر است (Kordi and Afshar-Mohammadian, 2019). بعلاوه، محتویات فنل کل در گلبرگ گونه زراعی جمع آوری شده از منطقه قائنات، ۸٦/٦۵ میلی گرم بر گرم گالیک اسید بود که میزان بالاتری را در مقایسه با پرچم سه گونه زعفران جمع آوری شده در استان گیلان نشان داد (Sariri *et al*., 2011) زیرا رشد و نمو گیاهان و سنتز متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]



شکل ٦- میزان فنل و فلاونل کل در پرچم سه گونه خزری، زیبا و زراعی زعفران. **حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد آزمون توکی هستند (P≤0.05).**

شرایط مختلف جغرافیایی، عوامل ژنتیکی و درجه حرارت می‌توانند تغییر کنند (Delgado *et al*., 2006).

در تحقیقی دیگر، Baba و همکاران (۲۰۱۵) مشخص شد که محتوای فنل کل در بافت‌های مختلف متفاوت بوده، به طوری که این محققین، میزان ترکیبات فنلی در عصاره اتانلی کلاله زعفران (۳/۵۳) و پس از آن در بنه (۲/٤٦) و برگ (۱/٦۱) واحد گزارش کردند. ترکیبات فنلی رایج‌ترین و وسیع‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دفاعی در گیاهان هستند. هر چقدر ترکیبات فنلی افزایش پیدا کنند، توانایی‌های آنتی اکسیدانی عصاره گیاه افزایش می‌یابند. ترکیبات فنلی با وزن مولکولی زیاد، توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جابجا شونده هیدروکسیل دارد (Lagouri and Boskou, 1996)؛ بنابراین، این ترکیبات می‌توانند به عنوان آنتی اکسیدان مؤثر عمل کنند. این در حالیست که برخی دیگر از اجزای گیاه زعفران از قبیل پرچم و گلبرگ به طور سنتی پس از جداسازی کلاله زعفران دور ریخته می‌شوند، در صورتی که می‌توانند به عنوان ماده مفیدی در صنایع دارویی و غذایی و نیز محصولات آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار گیرند (Kordi and Afshar-Mohammadian, 2019).

همچنین در تحقیق حاضر، میزان فلاونول در پرچم سه گونه زعفران خزری، زیبا و زراعی مورد بررسی قرار گرفت، به طوری که میزان فلاونول در پرچم گونه خزری خزری ۱۸/۳ mg/g، در پرچم گونه زیبا ۱۷/٤ mg/g و در پرچم گونه زراعی ۱٤/٦ mg/g به دست آمد. انواع مختلفی از ترکیبات متعلق به گروه فلاونوئیدها در گیاهان وجود دارند که طی مسیر سنتز فنل پروپانوئید در گیاه سنتز می‌شوند و غالباً شامل فلاونول، فلاون و آنتوسیانین ها هستند (Mazarie *et al*., 2018). نقش اصلی فلاونوئیدهای برگی، حفاظت از سلول‌های فتوسنتزی در مواجهه با پرتوهای مخرب فرابنفش است. در تنش‌های مختلف محیطی مانند زخم‌های مکانیکی، حمله پاتوژن‌ها، تنش سرمایی، تنش شوری، تنش نوری بالا و کمبود مواد غذایی، افزایش مقدار فلاونوئیدها گزارش شده است (Liakoura *et al*., 2001).

سنتز ترکیبات ثانویه احیایی، مکانیسمی برای حذف سنتز رادیکال‌های اکسیژن و آسیب‌های ناشی از بازدارندگی نوری است. فنیل پروپانوئیدهای مشتق از فنل فلاونوئیدها و تانن‌ها، نقش پاک کنندگی رادیکال‌ها را دارند (Selmar, 2008). این ترکیبات با تجمع در واکوئل سلول‌های اپیدرمی برگ و در ارتباط نزدیک با یک آنزیم پراکسیداز واکوئلی، جهت سم‌زدایی از آب اکسیژنه رسیده از سایر بخش‌های سلولی یا سلول‌ها عمل می‌کنند (Yamasaki *et al*., 1997). با این حال توان آنتی اکسیدانی انواع فلاونوئیدها یکسان نیست (Cooper-Driver and Bhattacharya, 1998). تجزیه و تحلیل محتوای فنل و فلاونوئید عصاره کلاله زعفران (آب جوش، الکلی و متانلی) توسط Karimi و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که حلال‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]

متفاوت، مقادیر مختلفی از فنل کل و فلاونوئیدها را در زعفران نشان می‌دهند و محتوای فنل و فلاونوئید به مقدار قابل توجهی در عصاره متانلی بالاتر است. براساس تحقیق حاضر، میزان فلاونل در دو گونه خزری و زیبا افزایش معنی داری را در مقایسه با گونه زراعی نشان داد. بر اساس نتایج تحقیقات قبلی ما، میزان فلاونل در گلبرگ گونه خزری ۲۲٦/٤۱ mg/g، گونه زیبا برابر با mg/g٤۳۲/٦۱ و در گونه زراعی mg/g ۲٦٤/۰ وزن خشک گلبرگ به دست آمد (Kordi and Afshar-Mohammadian, 2019).

Montoro و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که محتوای فلاونوئید در گلبرگ گونه زراعی جمع آوری شده در ایتالیا، mg/g ٦/۲۷ وزن خشک بوده که تقریباً نصف مقدار بدست آمده در تحقیق حاضر در پرچم گونه‌های زیبا و زراعی بود. Baba و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که محتوای فلاونوئید کل نیز در بافت‌های مختلف متفاوت بوده و ترکیبات فلاونوئید در عصاره اتانلی کلاله زعفران (۳/۵۳) بیشترین میزان را داشت و پس از آن بنه دارای ۲/٤٦ و برگ دارای ۱/٦۱ فلاونل بود که البته عوامل مختلفی مانند تغییرات آب و هوایی و جغرافیایی و ارتفاع محیط کشت می‌تواند بر میزان ترکیبات در گونه‌های مختلف زعفران تأثیرگذار باشد. تفاوت‌های موجود بین میزان کروسین و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در زعفران تولید شده در مناطق مختلف، زمینه را برای کشت زعفران در مناطق مختلف و متعاقباً انجام تحقیقات جهت ارزیابی تأثیر این مناطق بر کیفیت و کمیت تولید زعفران فراهم می‌کند (Zhang *et al*., 2019)..

منابع

کردی، ش. و افشارمحمدیان، م. (۱۳۹۷) ارزیابی مقایسه‌ای آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی گلبرگ سه گونهٔ زعفران.یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ٤۳۸–٤٤۸.

Afshar-Mohammadian, M., Kurdi, SH., and Mashhadinejad, A. (2016) Antibacterial activity of stigma and petal of different species of saffron (*Crocus* spp.). Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 29:265-273. (In Persian with English Summary)

Afraze, Z., Bolandi, M., Khorshidi, M., and Nafchi, A.M. (2014) Evaluation of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts (methanol, ethanol) saffron petals. Saffron agronomy and technology 2(3):231-236. (In Persian with English Summary)

Anjum, N., Pal, A., and Tripathi, Y.C. (2015) Phytochemistry and pharmacology of saffron, the most precious natural source of colour, flavour and medicine. SMU 2:335-346.

Aung, H. H., Wang, C. Z., Ni, M., Fishbein, A., Mehendale, S. R., Xie, J. T., Shoyama, A. Y., and Yuan, C. S. (2007) Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. Experimental oncology 29:175.

Baba, S. A., Malik, A. H., Wani, Z. A., Mohiuddin, T., Shah, Z., Abbas, N., and 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.

Bakhshi, D., and Arakawa, O. (2006) Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. Journal of Applied Horticulture 8:101-104.

Bukhari, S.I., Manzoor, M., and Dhar, M.K. (2018) A comprehensive review of the pharmacological potential of Crocus sativus and its bioactive apocarotenoids. Biomedicine & Pharmacotherapy 98:733-745.

Cooper-Driver, G.A., and Bhattacharya, M. (1998) Role of phenolics in plant evolution. Phytochemistry 49(5):1165-1174.

Delgado, M.C., Aramburu, A. Z., and Díaz-Marta, G.L.A. (2006) The chemical composition of saffron: color, taste and aroma. Bomarzo.

Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdelly, C., and Magné, C. (2012) Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 11:243-249.

Goli, S.A.H., Mokhtari, F., and Rahimmalek, M. (2012) Phenolic compounds and antioxidant activity from saffron (*Crocus sativus* L.) petal. Journal of Agricultural Science 4:175.

Goyal, S.N., Arora, S., Sharma, A.K., Joshi, S., Ray, R., Bhatia, J., Kumari, S., and Arya, D.S. (2010) Preventive effect of crocin of Crocus sativus on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastuctural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. Phytomedicine 17:227-232.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]

Horozić, E. (2020) Effects of extraction solvent/technique on the antioxidant and antimicrobial activity of spring saffron (*Crocus vernus* (L.) Hill). Acta Medica Saliniana 49(2).

Hosseinzadeh, H., Shamsaie, F., and Mehri, S. (2009) Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of Crocus sativus L. stigma and its bioactive constituents, crocin and safranal. Pharmacognosy Magazine 5:419.

Kafi, M., Hemmati Kakhki, A., and Karbasi, A. (2002) History of economic importance and area under cultivation, production, and applications of saffron in: saffron, production and processing technology, preparation, and compilation of Mohammad Kafi, Ferdowsi University of Mashhad Publications. (In Persian)

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., and Jaafar, H.Z. (2010) Evaluation of Crocus sativus L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. Molecules 15:6244-6256.

Kordi, S. H., and Afshar-Mohammadian, M. (2019) Comparative evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants of petal of three species of saffron. Nova Biologica Reperta 5:438-448. (In Persian)

Lagouri, V., and Boskou, D. (1996) Nutrient antioxidants in oregano. International journal of food sciences and nutrition 47(6):493-497.

Liakoura, V., Manetas, Y., and Karabourniotis, G. (2001) Seasonal fluctuations in the concentration of UV-absorbing compounds in the leaves of some Mediterranean plants under field conditions. Physiologia Plantarum 111(4):491-500.

Liu, T., Chu, X., Wang, H., Zhang, X., Zhang, Y., Guo, H., Liu, Z., Dong, Y., Liu, H., Liu, Y. , and Chu, L. (2016) Crocin, a carotenoid component of Crocus cativus, exerts inhibitory effects on L-type Ca^{2+} current, Ca^{2+} transient, and contractility in rat ventricular myocytes. *Canadian* journal of physiology and pharmacology 94:302-308.

Mazarie, A., Mousavi-Nik, S. M., and Fahmideh, L. (2018) Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. Nova Biologica Reperta 4:299-309. (In Persian)

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and Van Beek, T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry 85(2):231-237.

Montoro, P., Tuberoso, C. I., Maldini, M., Cabras, P., and Pizza, C. (2008) Qualitative profile and quantitative determination of flavonoids from *Crocus sativus* L. petals by LC-MS/MS. Natural Product Communications 3: 1934578X0800301215.

Mykhailenko, O., Kovalyov, V., Goryacha, O., Ivanauskas, L., and Georgiyants, V. (2019) Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus Crocus: A review. Phytochemistry 162:56-89.

Narasimhan, S., Chand, N., and Rajalakshmi, D. (1992) Saffron: quality evaluation by sensory profile and gas chromatography. Journal of food quality 15:303-314.

Pennycooke, J.C., Cox, S., and Stushnoff, C. (2005) Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (Petunia× hybrida). Environmental and Experimental Botany 53:225-232.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., and Shahabimajd, N. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African journal of biotechnology *5*: 23-43.

Rouhani, R., Eyenafshar, S., and Ahmadzadeh, R. (2015) Study of anthocyanin and antioxidant compounds derived ethanol extract saffron flag with the help of ultrasound technology. Iranian Food Science and Technology Research Journal 11:161-170. (In Persian)

Rubio-Moraga, A., Trapero, A., Ahrazem, O., and Gómez-Gómez, L. (2010) Crocins transport in Crocus sativus: the long road from a senescent stigma to a newborn corm. Phytochemistry 71:1506-1513.

Sariri, R., Sabbaghzadeh, R., and Poumohamad, F. (2011) In-vitro antioxidant and anti-tyrosinase activity of methanol extracts from Crocus sativus flowers. Pharmacologyonline 2:1205-1215.

Sarikurkcu, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., and Harmandar, M. (2008) Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. globosum (*lamiaceae*) by three different chemical assays. Bioresource Technology 99:4239-4246.

Selmar, D. (2008) Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. Landbauforschung Volkenrode 58:139.

Slinkard, K., and Singleton, V.L. (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture 28:49-55.

Sohei, A., and Peyvandi, K. (2014) Extraction of effective compounds from saffron flag by Souxleh device using organic solvents. 15th National Congress of Iranian Chemical Engineering ICHEC15_119, p. 5. (In Persian)

Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Ikehara, N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H2O2. Plant Physiology 115:1405-1412.

Zhang, A., Shen, Y., Cen, M., Hong, X., Shao, Q., Chen, Y., and Zheng, B. (2019) Polysaccharide and crocin contents, and antioxidant activity of saffron from different origins. Industrial crops and products, 133:111-117.

Zeka, K., Ruparelia, K.C., Continenza, M.A., Stagos, D., Vegliò, F., and Arroo, R. R. (2015) Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. Fitoterapia 107:128-134.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]

The stamen and stigma of some species of wild saffron (*Crocus sp.*) as a rich source of antioxidants

Fatemeh Shahinfar[1], Sara Taghikhah-Khomami[1], Seyedeh Fatemeh Fallah[2], Mansour Afshar-Mohammadian[2*], Davod Bakhshi[3]

[1] **Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran**
[2]**Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Golestan, Gorgan, Iran**
[3]**Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran**

(Received: 29/05/2020, Accepted: 01/12/2020)

Abstract

Saffron (*Crocus sp*.), is widely used in the food industry and is used as a flavoring and natural coloring agent. A comparative evaluation of the antioxidant activity in the stamen, as well as the effective and medicinal material of crocin in stigma in the agronomic species of saffron (*C. sativus*) in comparison with the native wild species of *C. speciosus* and *C. caspius* collected from Guilan province, were the main objectives of this study. The results of this study showed that the medicinal material of crocin in the stigma of *C. speciosus* and *C. caspius* with a significant difference was higher than *C. sativus*, whereas the amount of crocin in the stamen of *C. sativus* with a significant difference was higher than *C. speciosus* and *C. caspius*. The results of the present study also showed that the amount of total phenol and as well as the amount of the antioxidant activity (DPPH) in the stamen of *C. sativus* was significantly higher than the two species of *C. speciosus* and *C. caspius*, whereas the amount of flavonol in *C. speciosus* and *C. caspius* was significantly higher than *C. sativus*. Due to the fact that until now, the saffron stamen was considered as unusable part of saffron, according to the results of this study, the high level of antioxidant activity as well as the medicinal composition of crocin in the stamen of saffron, in addition to stigma, in the agronomic and wild species of saffron, this part of saffron has significant potential as a rich source of antioxidants, enriching people's food baskets and in a variety of pharmaceutical and food programs.

Keywords: Wild saffron, Agronomic saffron, Crocin, Stamen, Stigma

Corresponding author, Email: afshar@guilan.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.8.0]