



## بررسی و مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی، فنل‌های کل و فلاونوئیدهای گلبرگ زعفران (*Corcus sativus* L.) کاشته شده در مناطق مختلف استان لرستان

علی محمدیان<sup>۱\*</sup>، حسن احمدوند<sup>۲</sup>، رضا کرمان<sup>۳</sup>، رضا سیاه منصور<sup>۴</sup>، علی سپهوند<sup>۵</sup> و شهرام امیدواری<sup>۶</sup>

تاریخ دریافت: ۲۴ بهمن ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۵

محمدیان، ع.، احمدوند، ح.، کرمان، ر.، سیاه منصور، ر.، سپهوند، ع. و امیدواری، ش. ۱۳۹۶. بررسی و مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی، فنل‌های کل و فلاونوئیدهای گلبرگ زعفران (*Corcus sativus* L.) کاشته شده در مناطق مختلف استان لرستان. زراعت و فناوری زعفران، ۵(۱): ۵۱-۶۰.

### چکیده

زعفران یکی از ارزشمندترین محصولات غذایی و دارویی است که از نظر کشاورزی و اقتصادی در ایران و جهان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. امروزه عوامل مخرب محیطی باعث می‌شوند که بدن انسان نتواند با رادیکال‌های آزاد که طی عمل تنفس تولید می‌شوند مبارزه کند. در نتیجه سلول‌های بدن توسط رادیکال‌های آزاد تخریب شده و منجر به پیری زودرس و بیماری‌هایی مانند سرطان و تصلب شرائین می‌شوند. با توجه به محدود بودن کشت زعفران به چند کشور دنیا در زمینه تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران تحقیقات زیادی صورت نگرفته است. این پژوهش جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در گلبرگ‌های زعفران و تعیین مقادیر فنل‌های کل و فلاونوئیدها از مزارع کاشت زعفران استان لرستان انجام گرفت. پس از تعیین مزارع کاشت زعفران بروش سیستماتیک تصادفی از گلبرگ‌های زعفران نمونه مرکب (۲ کیلوگرم گلبرگ زعفران) تهیه شد. سپس به‌منظور اندازه‌گیری و تعیین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی، مقادیر فنل و فلاونوئیدهای کل موجود در عصاره گلبرگ زعفران به‌ترتیب از روش‌های به دام اندازی رادیکال‌های آزاد (روش DPPH)، روش فولین سیوکا و روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده گردید. نتایج مقایسات میانگین مقادیر  $IC_{50}$  موجود در گلبرگ زعفران مزارع مختلف با آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که مقدار  $IC_{50}$  مزارع نورآباد و ویسیان بترتیب با مقادیر ۱/۶۶ و ۱۵۶/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین و کمترین خواص آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با سایر مزارع دارا می‌باشند. نتایج مقایسه مقادیر فنل‌ها و فلاونوئیدهای کل موجود در گلبرگ زعفران مزارع با آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که مقدار فنل کل با ۱۰۹۸/۸ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره هیدروالکلی مربوط به نورآباد و فلاونوئید با مقدار ۴۱/۳۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره هیدروالکلی مربوط به چغلودی بیشترین مقادیر را در مقایسه با سایر مزارع به خود اختصاص دادند. نتایج مقایسه بین مقادیر  $IC_{50}$  به دست آمده از گلبرگ‌های زعفران مزارع مورد بررسی و BHT آنتی‌اکسیدان سنتزی و مصنوعی با آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) نشان داد که کمترین اختلاف به دست آمده متعلق به مزارع خرم‌آباد و چغلودی به‌ترتیب با مقادیر اختلاف ۴/۴۰ و ۵/۳۸ از بین سایر مزارع می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** آنتی‌اکسیدان طبیعی، رادیکال‌های آزاد، رنگ سنجی، کشت زعفران.

۱- محقق مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی استان لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- محقق بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد، ایران

۳- دانشیار گروه شیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

۴- استادیار بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد، ایران

۵- استادیار بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد، ایران

\*- نویسنده مسئول: (Mohammadian53@yahoo.com)

## مقدمه

اشاره نمود (Temerdashev et al., 2011). تحقیقات انجام شده جهت شناسایی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلبرگ‌های زعفران بیانگر این است که گلبرگ‌های زعفران حاوی ۳/۴۲ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک ترکیبات فنلی می‌باشد. نتایج تحقیقات انجام شده به منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی زعفران با استفاده از روش DPPH عصاره گلبرگ آن با غلظت ۵۰۰ پی پی ام نشان داد که عصاره گلبرگ آن دارای (۷۴/۲ تا ۹۱/۴ درصد) خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که در مقایسه با خواص آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی از قبیل TBHQ (۷۷/۹ تا ۹۳/۱ درصد دارای خواص آنتی‌اکسیدانی) درصد قابل قبولی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داده است (Hossin Goli et al., 2012). رادیکال‌های آزاد اتم‌های تک الکترونی هستند که در طی عمل تنفس یا در حین واکنش اکسیژن با برخی از مولکول‌ها تولید می‌شوند. افزایش تعداد این اتم‌ها در بدن و واکنش آنها با سایر قسمت‌های سلول مانند DNA و غشای سلولی می‌تواند باعث تخریب سلول یا حتی مرگ آنها شوند. سیستم دفاعی بدن در حالت عادی این رادیکال‌های آزاد را خنثی و بی‌ضرر می‌کند (Konczak et al., 2010). اشعه ماوراء بنفش، الکل و آلودگی‌های محیطی موجب می‌شوند تا بدن انسان قادر به مبارزه علیه این رادیکال‌های آزاد نباشد. در نتیجه ساختمان و عمل سلول‌های بدن توسط رادیکال‌های آزاد تخریب شده و منجر به بروز پیری زودرس و بیماری‌هایی مانند سرطان و تصلب شرائین می‌شوند. با توجه به عوارض سوء رادیکال‌های آزاد حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جهت حفظ سلامت ما ضروری به نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش سرعت اکسیداسیون مشخصاً دوره اکسیداسیون کند را افزایش می‌دهند. آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است به‌طور طبیعی (مثل آنتوسیانین‌ها در گلبرگ زعفران) و یا سنتزی به مواد غذایی اضافه شوند (Wojdylo et al., 2007). امروزه ترکیبات

زعفران گیاهی است چند ساله، علفی با نام علمی *L. Crocus sativus* که به خانواده زنبق تعلق دارد. گل زعفران اولین اندامی است که در اوایل پاییز ظاهر می‌شود و دارای سه کلاله همراه با خامه است که پس از خشک کردن، زعفران تجاری را تشکیل می‌دهد (Khademi, 2011). از ترکیبات شیمیایی زعفران می‌توان: کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی، موسیلاژها، ویتامین‌ها (بخصوص ریوفلاوین)، رنگدانه‌ها (کروسین، آنتوسیانین، کاروتن، لیکوپن و زئازانتین)، اسانس تربنی معطر (سافرانال) و مواد طعم دهنده (پیکروکروسین) را نام برد. زعفران به دلیل نیاز آبی کم، سهولت در کاشت، داشت و عملکرد مناسب از اهمیت اقتصادی بسزایی برخوردار است (Fernandez, 2004). عصاره کلاله و گلبرگ زعفران اثرات ضدالتهابی و ضددردی در مدل‌های حیوانی از خود نشان داده‌اند (Hosseinzadeh & Younesi, 2002). از زعفران در طب سنتی به‌عنوان گیاه شادی آور یاد می‌شود (Mirheidar, 1993; Zargari, 1990). زعفران در کاهش چربی و کلسترول خون مؤثر است همچنین در درمان دردهای عصبی، تشنج و افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Khademi, 2011). با توجه به محدود بودن کشت زعفران به چند کشور دنیا در زمینه تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی و شناسایی ترکیبات موجود در گلبرگ زعفران تا کنون تحقیقات زیادی صورت نگرفته است. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که گلبرگ‌های جنس *Crocus* که زعفران نیز در آن گروه قرار دارد دارای ترکیبات فلاونوئید، گلیکوزید و آنتوسیانین‌ها می‌باشند (Gil & Kaber, 2002; Omidi et al., 2014). ترکیبات فنلی خوراکی و غیر خوراکی گیاهان دارای اثرات متفاوت زیستی می‌باشند از جمله می‌توان به خصوصیات ضد فساد و آنتی‌باکتریالی همچنین دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی آنها به دلیل خنثی کردن رادیکال‌های آزاد

آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در گلبرگ زعفران کاشته شده در مناطق مختلف این استان انجام شود. استان لرستان در غرب ایران بین ۳۲ درجه و ۳۷ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۲۲ دقیقه عرض شمالی و ۴۶ درجه و ۵۱ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۳۰ دقیقه طول شرقی با وسعت حدود ۲۸۵۵۹ کیلومتر مربع واقع شده است این استان به لحاظ اقلیمی، یک استان چهار فصل است و دارای آب و هوای متنوعی می‌باشد. این تنوع از شمال به جنوب و از شرق به غرب کاملاً محسوس است.

### مواد و روش‌ها

ابتدا از بین مزارع کاشت زعفران در استان تعداد ۸ مزرعه انتخاب و سپس با روش سیستماتیک تصادفی اقدام به نمونه‌گیری (نمونه مرکب) از گلبرگ‌های زعفران به میزان ۲ کیلوگرم از هر مزرعه گردید. این تحقیق در قالب طرح CRD با ۸ تیمار و ۳ تکرار (تیمارها: مزارع کاشت زعفران می‌باشند که ویژگی‌های نظیر: خواص آنتی‌اکسیدانی، مقادیر فنل‌ها و فلاونوئیدهای کل گلبرگ زعفران در آنها بررسی شد) انجام گردید. در جدول ۱ مشخصات جغرافیایی مزارع منتخب آورده شده است. سپس عصاره هیدروالکلی از نمونه گلبرگ‌های جمع آوری شده از مزارع تهیه و خواص آنتی‌اکسیدانی، مقادیر کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به روش‌های زیر تعیین گردید:

#### بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ‌ها

به منظور تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی از روش فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد یا روش DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) استفاده شد که از طریق فرمول زیر قابل محاسبه است (Brand-Williams et al, 1995). در این فرمول A sample و blank A به ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه‌ها می‌باشند. بیان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره به صورت IC<sub>50</sub> نشان دهنده غلظتی از عصاره است که برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH مورد نیاز است.

فنلی مانند BHT, TBHQ و BHA متداول‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی هستند که از لحاظ سم‌شناسی مطالعه شده‌اند و در سال‌های اخیر استفاده از این نوع آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل اثبات عوارض منفی آنها بر سلامت انسان با چالش جدی مواجه شده است و جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌جای آنها بصورت جدی مطرح می‌باشد (Schieber et al., 2001; Kosar et al., 2011). نتایج تحقیقات انجام شده به‌منظور شناسایی ترکیبات موجود در گلبرگ‌های گونه‌های جنس *Crocus* در دانمارک نشان داد که حدود ۹ ترکیب آنتوسیانین شامل ۴ نوع Delphinidin، ۴ نوع Petunidin و Malvidin همچنین ۲۷ نوع فلاونوئید که عمده‌ترین آنها Myricetin، Quercetin، Aempferol و Apigenin می‌باشند، شناسایی گردید (Norbaek & Kondo, 2002). نتایج بررسی و مقایسه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مربوط به زعفران و چهار گونه گیاهی نشان داد که مقدار فنل کل به‌دست آمده از زعفران با مقدار ۶/۳۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک از دو گیاه *Eugenia caryophyllate* و *Lavandula stoechas* بیشتر بوده و در مقایسه با گیاهان *Curcuma domestica* و *Curcuma longa* از مقدار فنل کل کمتری برخوردار می‌باشد (Chen et al., 2008). نتایج تحقیقات (Murugaian et al., 2009) نشان داد که مقدار فلاونوئید کل عصاره الکلی برگ زعفران در مقایسه با عصاره الکلی برگ *Piper betel* با مقدار ۰/۶۶ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک مقدار بالاتری را به خود اختصاص داده است. روند روبه رشد افزایش و توسعه کاشت زعفران در شرایط مختلف آب و هوایی کشور به‌ویژه استان لرستان در دهه گذشته، از طرفی تولید مقادیر قابل ملاحظه‌ای گلبرگ زعفران در مزارع این استان (از ۱۰۳ کیلوگرم گل زعفران یک کیلوگرم کلاله زعفران ممتاز به دست می‌آید) که معمولاً دور ریخته می‌شوند و کاربردی ندارند، موجب گردید تا پژوهش حاضر با هدف بررسی و تعیین میزان خواص

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مزارع منتخب  
Table 1- Geographic characteristic of chosen farms

مزارع Farms	عرض جغرافیایی - شمالی Latitude-n	طول جغرافیایی - شرقی Longitude-e	ارتفاع از سطح دریا Elevation (m)
رباط Robat	33° 35'	48° 20'	1380
ویسیان Vician	33° 20'	48° 10'	980
چغلووندی Chaghlvandi	33° 42'	48° 33'	1680
نورآباد Noorabad	33° 55'	48° 05'	1915
کمالوند Kamalvand	33° 26'	48° 25'	1365
خرم‌آباد Khoramabad	33° 20'	48° 20'	1210
چگنی Chegani	33° 20'	48° 12'	1010
الشتر Aleshtar	33° 50'	48° 20'	1890

میکرولیتر از معرف Follin-Ciocalteu مخلوط شدند. در نهایت جذب محلول‌ها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. سپس مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره گلبرگ‌های زعفران با استفاده از منحنی اسید گالیک محاسبه گردید. پس از رسم منحنی کالیبراسیون اسید گالیک، معادله خطی منحنی به دست آمد که با قرائت مقادیر جذب به دست آمده از عصاره‌ها در این معادله غلظت معادل اسید گالیک از عصاره‌ها محاسبه شد. غلظت به دست آمده بر حسب ppm (میلی گرم) می‌باشد.

#### تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل

میزان کل فلاونوئیدها در این تحقیق به روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم با استفاده از کوئرستین به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002). هر کدام از عصاره‌های متانولی گیاهی (۰/۵ ml از ۱۰ g.ml<sup>-1</sup>) به صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم

مقدار IC<sub>50</sub> کمتر نشان دهنده قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره مربوطه می‌باشد. همچنین به عنوان کنترل مثبت برای انجام آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) بین مقادیر IC<sub>50</sub> موجود در گلبرگ زعفران مزارع مختلف با شاهد از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن) استفاده شد که در شرایط آزمایشگاهی این تحقیق مقدار IC<sub>50</sub> اندازه‌گیری شده برای BHT، ۵۰/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

$$\text{درصد بازدارندگی} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

#### تعیین مقدار ترکیبات فنل‌های کل

مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره گلبرگ‌های زعفران با روش معرف Follin-Ciocalteu و با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد تعیین گردید (Kowalczyk et al., 2012). برای این منظور محلول مادر با کمک گالیک اسید به مقدار ۰/۴ گرم تهیه شد. در این آزمایش ۲۰ میکرولیتر از عصاره گلبرگ زعفران با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر، با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰

(Milan, 2011) در خصوص وجود ارتباط معنی‌دار بین خواص آنتی‌اکسیدانی مواد گیاهی با محتویات ترکیبات فنولیک آنها با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. با توجه به نتایج به دست آمده در این خصوص توجه به این نکته ضروری است که با وجود اثبات همبستگی مثبت بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی این رابطه در همه موارد صادق نیست. به‌عنوان مثال مقادیر فنل کل اندازه‌گیری شده به ترتیب در مزارع رباط و چغلوندی ۸۰۱/۹ و ۵۵۹/۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره هیدروالکلی و مقادیر IC<sub>50</sub> این مزارع به ترتیب ۷۶/۲ و ۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به خود اختصاص دادند طبق نتایج مشاهده می‌شود که مزرعه چغلوندی با وجود داشتن ترکیبات فنلی بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری در مقایسه با مزرعه رباط برخوردار می‌باشد. در واقع با وجود این که افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به حضور آنتی‌اکسیدان‌ها به ویژه ترکیبات فنلی نسبت داده می‌شود، اما میزان خواص آنتی‌اکسیدانی بسته به ساختمان شیمیایی این ترکیبات متفاوت است. علاوه بر این در طی عمل استخراج ترکیبات دیگری نظیر اسکوربیک اسید، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و قندها که خود اهدا کننده الکترون می‌باشند به همراه ترکیبات فنلی وارد عصاره می‌شوند. همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی علاوه بر موارد مذکور تحت تأثیر فاکتورهای ژنتیکی و عوامل محیطی و آب و هوایی از جمله میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک و شرایط نگهداری پس از برداشت قرار می‌گیرد (Rafiei et al., 2012). نتایج به دست آمده توسط (Thoo et al., 2010) با نتایج این تحقیق در این خصوص همخوانی دارد.

#### بررسی مقادیر فلاونوئیدها

بر اساس نتایج حاصله از جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) مشخص شد که بین مقادیر فلاونوئیدهای موجود در گلبرگ زعفران مزارع مختلف استان در سطح یک درصد اختلاف

(۱۰٪ متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱M) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها را در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند. در این تحقیق تجزیه واریانس داده‌ها برای تیمارها انجام گرفت. همچنین به منظور مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و به منظور مقایسه مقادیر IC<sub>50</sub> به دست آمده از گلبرگ‌های زعفران مزارع مورد بررسی با تیمار شاهد (BHT) از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) با نرم افزار آماری Spss ver 19 استفاده شد.

#### نتایج و بحث

##### بررسی مقادیر فنل‌های کل

نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که بین مقادیر فنل‌های کل موجود در گلبرگ‌های زعفران مزارع مختلف استان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. پس از مقایسات میانگین مقادیر فنل‌های کل موجود در گلبرگ زعفران مزارع مختلف استان با آزمون چند دامنه‌ای دانکن (جدول ۳) مشخص گردید که بیشترین و کمترین مقادیر فنل‌های کل به ترتیب متعلق به مزارع نورآباد و ویسیان می‌باشد. در خصوص بررسی ترکیبات فنلی می‌توان گفت که ترکیبات فنلی متابولیت‌های ثانویه هستند که توان آنتی‌اکسیدان بالایی دارند در واقع باعث حذف و جلوگیری از ایجاد رادیکال‌های آزاد و رسوب عناصر اکسیدان مانند آهن می‌شوند (Wong et al., 2006). نتایج نشان داد که فنل‌های کل با مقادیر ۱۰۹۸/۱ و ۹۹۸/۸ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره هیدروالکلی بترتیب مربوط به مزارع نورآباد و چگنی بیشترین مقادیر را به خود اختصاص داده‌اند این در حالی است که میزان خواص آنتی‌اکسیدانی آنها نیز در مقایسه با سایر مزارع بیشترین مقدار می‌باشد. نتایج تحقیقات (Chimi, 1991 ; )

زعفران مزارع مورد بررسی استان در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود دارد. نتایج مقایسات میانگین با آزمون دانکن نشان داد که میزان  $IC_{50}$  عصاره هیدروالکلی به دست آمده از گلبرگ‌های زعفران به ترتیب با مقادیر ۱/۶۶ و ۱۵۶/۴ میکروگرم بر میلی لیتر مربوط به مزارع نورآباد و ویسیان کمترین و بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). طبق نتایج به دست آمده وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر  $IC_{50}$  موجود در عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران مزارع مورد بررسی در این پژوهش به اثبات رسید و مشخص گردید که مقدار  $IC_{50}$  موجود در گلبرگ زعفران مزارع نورآباد و چگنی به ترتیب با مقادیر ۱/۶۶ و ۳/۶۷ میکروگرم بر میلی لیتر با کمترین مقدار  $IC_{50}$  توانسته‌اند بیشترین میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد (خواص آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر) را در مقایسه با سایر مزارع از خود نشان دهند. با مقایسه اختلاف ارتفاع بین مزارع نورآباد و چگنی با ۱۹۱۵ و ۱۰۱۰ متر از سطح دریا به ترتیب مرتفع‌ترین و تقریباً پست‌ترین مناطق از بین مزارع مورد بررسی می‌باشند و توجه به این که مزارع مذکور از خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به سایر مزارع برخوردار می‌باشند این نکته استنباط می‌شود که تأثیر فاکتور ارتفاع از سطح دریا از میان فاکتورهای محیطی اثر گذار بر خواص آنتی‌اکسیدانی، دارای اهمیت کمتری می‌باشد.

معنی داری وجود دارد. پس از مقایسات میانگین مقادیر فلاونوئید موجود در گلبرگ زعفران مورد بررسی از مزارع مختلف استان لرستان با آزمون چند دامنه‌ای دانکن (جدول ۳) مشخص گردید که مزارع چغلوندی و رباط به ترتیب با مقادیر ۴۱/۳۹ و ۳۵/۰۸ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره هیدروالکلی بیشترین و مزرعه ویسیان با مقدار ۱۳/۰۳ میلی گرم بر گرم عصاره کمترین مقادیر فلاونوئید را به خود اختصاص دادند. از طرفی مقادیر فلاونوئید کل مزارع نورآباد و چگنی به ترتیب با مقادیر ۱۶/۳۳ و ۱۵/۸ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره هیدروالکلی در مقایسه با فلاونوئید سایر مزارع مقادیر کمتری را به خود اختصاص داده‌اند. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که بین مقادیر فلاونوئید کل و میزان خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ‌های زعفران همبستگی مثبت وجود ندارد. نتایج تحقیقات (Norbaek et al., 2002) در خصوص شناسایی ترکیبات موجود در گلبرگ‌های گونه‌های جنس *Crocus* نشان داد که ۲۷ نوع فلاونوئید از آنها شناسایی و تعیین گردید.

#### بررسی مقادیر $IC_{50}$

نتایج به دست آمده در جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان می‌دهد که بین مقادیر  $IC_{50}$  عصاره هیدروالکلی گلبرگ‌های

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات تیمارهای مقادیر کل فنل‌ها، فلاونوئیدها و  $IC_{50}$  مزارع مختلف زعفران

Tabel 2- Results of variance analysis treatments: Total phenolic content, flavonoid content and  $IC_{50}$  between of saffron farms

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	مجموع مربعات میانگین Ms	فنل کل Total phenolics (Mg Gae/gr exc)	فلاونوئید کل Total flavonoid (Mg cou/gr exc)	غلظت مهار کننده ۵۰٪ رادیکال‌ها $IC_{50}$ (μgr/ml)
تیمار Treatment	7		312277.9**	313.7**	7861.53**
خطا Error	16		1.027	1.00	0.75

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

\*\* Significant at 1% probability level.

جدول ۳- مقایسات میانگین تیمارهای مقادیر کل فنل‌ها، فلاونوئیدها و IC<sub>50</sub> در مزارع مختلف زعفران

Table 3- Mean comparisons treatments: total phenolic content, flavonoid content and IC<sub>50</sub> among of saffron farms

مزارع Farms	فنل کل Total phenolics Mg Gae/g exc	فلاونوئیدکل Total flavonoids Mg Cou/g exc	IC <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> content µgr/ml
رباط Robat	801.9 <sup>d</sup>	35.08 <sup>b</sup>	76.2 <sup>d</sup>
ویسیان Vician	353.3 <sup>g</sup>	13.03 <sup>f</sup>	156.4 <sup>a</sup>
چغلوندی Chaghlvandi	559.3 <sup>f</sup>	41.39 <sup>a</sup>	56.0 <sup>e</sup>
نورآباد Noorabad	1098.1 <sup>a</sup>	16.33 <sup>e</sup>	1.66 <sup>h</sup>
کمالوند Kamalvand	712.6 <sup>e</sup>	25.56 <sup>c</sup>	80.81 <sup>c</sup>
خرم‌آباد Khorramabad	890.7 <sup>c</sup>	22.05 <sup>d</sup>	46.22 <sup>f</sup>
چگنی Chegani	998.8 <sup>b</sup>	15.8 <sup>e</sup>	3.67 <sup>g</sup>
الشتار Aleshtar	704.1 <sup>e</sup>	16.28 <sup>e</sup>	102.3 <sup>b</sup>

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری دارند.

Means in each column followed by dissimilar letter are significantly different at 5% probability level using Duncan,s Test.

#### مقایسه مقادیر IC<sub>50</sub> با شاهد BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن)

نتایج مقایسه بین مقادیر IC<sub>50</sub> عصاره هیدروالکلی گلبرگ‌های زعفران مورد بررسی و BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن) آنتی‌اکسیدان سنتزی و مصنوعی به‌عنوان کنترل مثبت از طریق آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) (جدول ۴) نشان داد که کمترین اختلاف به‌دست آمده متعلق به مزارع خرم‌آباد و چغلوندی (به‌ترتیب با مقادیر تفاضل ۴/۴۰ و ۵/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بیشترین اختلاف مربوط به مزارع ویسیان و الشتر (به ترتیب با مقادیر تفاضل ۱۰۵/۸ و ۵۱/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. به‌عبارت دیگر بیشترین قرابت با BHT مورد استفاده در صنایع غذایی و دارویی مربوط به مزارع خرم‌آباد و چغلوندی می‌باشد.

نتایج مقایسه بین مقادیر IC<sub>50</sub> به دست آمده از گلبرگ‌های زعفران مزارع مورد بررسی و BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن) آنتی‌اکسیدان سنتزی و مصنوعی به‌عنوان کنترل مثبت با آزمون

حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) نشان داد که کمترین اختلاف به‌دست آمده متعلق به مزارع خرم‌آباد و چغلوندی بترتیب با مقادیر اختلاف ۴/۴۰ و ۵/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین اختلاف بترتیب مربوط به مزارع ویسیان و الشتر با مقادیر اختلاف ۱۰۵/۸ و ۵۱/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. به عبارت دیگر بیشترین قرابت IC<sub>50</sub> گلبرگ زعفران مزارع مورد بررسی با BHT مورد استفاده در صنایع غذایی و دارویی مربوط به مزارع خرم‌آباد و چغلوندی می‌باشد. در این راستا نتایج به دست آمده نشان داد که در حدود ۴۰ درصد از مزارع مورد بررسی (۳ تا ۸ مزرعه) میزان خواص آنتی‌اکسیدانی به دست آمده از گلبرگ‌های زعفران آنها بیشتر از مقدار BHT می‌باشد. نتایج تحقیقات انجام شده (Mokhtari et al., 2012; Karimi et al., 2010) در خصوص مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ‌های زعفران با BHT و TBHQ با نتایج این مقاله همخوانی دارد.

جدول ۴- مقایسه میانگین مقادیر  $IC_{50}$  و BHT با آزمون حداقل اختلاف معنی داری (LSD)Table 4- Means comparisons  $IC_{50}$  content with BHT using LSD test

مزارع Farms	$IC_{50}$ content	شاهد (BHT) Controller	اختلاف میانگین $IC_{50}$ با شاهد Means difference $IC_{50}$ with controller	مقدار احتمال P- value
رباط Robat	76.2 <sup>d</sup>	50.63	25.57	P<0.05
ویسیان Vician	156.4 <sup>a</sup>	50.63	105.77	P<0.05
چغلوندی Chaghlvandi	56.0 <sup>e</sup>	50.63	5.37	P<0.05
نورآباد Noorabad	1.66 <sup>h</sup>	50.63	-48.97	P<0.05
کمالوند Kamalvand	80.81 <sup>c</sup>	50.63	30.18	P<0.05
خرم آباد Khorrabad	46.22 <sup>f</sup>	50.63	-4.41	P<0.05
چگنی Chegani	3.67 <sup>g</sup>	50.63	-46.96	P<0.05
الشتار Aleshtar	102.3 <sup>b</sup>	50.63	51.67	P<0.05

در هر ستون میانگین های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری دارند.

Means in each column followed by dissimilar letter are significantly different at 5% probability level using LSD test.

است، بنابراین می توان از خواص آنتی اکسیدانی طبیعی گیاهان از جمله گلبرگ های زعفران به نحو مقتضی و سایر فرآورده های غذایی، دارویی و صنعتی به صورت عصاره بدون فراوری مانند بسیاری از گیاهان دیگر بهره جست. از طرفی وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر متابولیت های ثانویه همچنین خواص آنتی اکسیدانی موجود در گلبرگ های زعفران مناطق مختلف استان لرستان انجام تحقیقات در زمینه چگونگی بوجود آمدن این تغییرات را ضروری می نماید. اهمیت این موضوع زمانی دو چندان به نظر می رسد که اثرات برخی از فاکتورهای محیطی از جمله ارتفاع از سطح دریا بر میزان خواص آنتی اکسیدانی کم تأثیر به نظر می رسد. طبق نتایج به دست آمده با وجود اثبات رابطه بین میزان ترکیبات فنلی با خواص آنتی اکسیدانی وجود این رابطه میان فلاونوئیدها و خواص آنتی اکسیدانی به اثبات نرسید که این خود بر این نکته دلالت دارد که احتمالاً سایر عوامل و ترکیبات موجود مانند آنتوسیانین ها و... می تواند بر این

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش در خصوص تعیین خواص آنتی اکسیدانی گلبرگ های زعفران مشخص شد که به طور کلی گیاه زعفران علاوه بر ارزش اقتصادی بالا ناشی از فروش کلاله آن که همان محصول تجاری زعفران محسوب می شود می تواند به عنوان یکی از گیاهان دارای منابع آنتی اکسیدان طبیعی نیز مطرح باشد. نتایج تحقیقات انجام شده توسط (Hossin Goli et al., 2012; Chen et al., 2008; Omidi et al., 2014) در خصوص تعیین خواص آنتی اکسیدانی گلبرگ های زعفران با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

### نتیجه گیری

امروزه با اثبات اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان های مصنوعی نظیر BHT، BHA، TBHQ و پروپیل گالات بر سلامت انسان همچنین رویکرد افزایش به مصرف افزودنی های طبیعی تمایل به استفاده از منابع آنتی اکسیدان های طبیعی را چند برابر نموده



نیست و نقش سایر ترکیبات و عوامل ژنتیکی و محیطی را در این خصوص نمی‌توان نادیده گرفت. با توجه به این که امروزه در مطالعات و پژوهش‌ها از BHT به‌عنوان شاهد (شاخص آنتی‌اکسیدان) استفاده می‌گردد اما توصیه به کاربرد مواد گیاهی از جمله گلبرگ‌های زعفران و افزودن آن به مواد غذایی بدون در نظر گرفتن سایر ترکیبات و انجام تحقیقات بیشتر از نظر ایمنی و خواص کیفی منطقی به نظر نمی‌رسد اما مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی با شاهی مانند BHT، به‌عنوان گامی مؤثر و ضروری در جهت شناخت و معرفی منابع حاوی آنتی‌اکسیدان طبیعی محسوب می‌گردد.

رابطه اثر گذار باشند که خود تحقیقات بیشتر در این خصوص را می‌طلبد. نتایج این مطالعه نشان داد که گلبرگ‌های زعفران کاشته شده در مزارع مناطق مختلف آب و هوایی استان لرستان دارای مقادیر مختلف و قابل توجهی از متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها بوده و به تبع دارای خواص آنتی‌اکسیدانی متفاوتی می‌باشند. در واقع زعفران مناطقی که مقدار خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان داده‌اند می‌توانند جهت استفاده این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی معرفی شوند. نتایج به دست آمده بیانگر این است که با وجود اثبات همبستگی مثبت بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی این رابطه در همه موارد صادق

## منابع

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 28: 25-30.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wenh. M., and Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chen, Y., Zhang, H., Tian, X., Zhao, C., Cai, L., Liu, Y., Jia, L., Yin, H.X., and 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 Chemistry* 109: 484-492.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillar, P., and Rahmani, M. 1991. The peroxy and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68: 307-312.
- Fernandez, J.A. 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Development of Plant Science* 2: 127-159.
- Gil, M.I., and Kaber, A.A. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, Carotenoids and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of the Agricultural Food Chemistry* 50: 4976-4982.
- Hossein Goli, S.A., Mokhtari, F., and Rahimmalek, M. 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal. *Journal of Agricultural Science* 4 (10): 175-181.
- Hosseinzadeh, H., and Younesi, H. 2002. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *Bio Med Central Pharmacology and Toxicology* 2: 1-8. (In Persian).
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., and Jaafar, H. 2010. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Journal Molecules* 15: 6245-6249.
- Khademi, K. 2011. Acquaintance about *Crocus sativa* agriculture. *Propagation Publication*

- Agriculture Jihad organization 1 (90): 1-19. (In Persian).
- Konczak, I., Zabarar, D., Dunstan, M., and Aguas, P. 2010. Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. *Food Chemistry* 122: 260-266.
- Kosar, M., Goger, F., and Baser, K.H.C. 2011. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *salvia halophila* hedge from turkey. *Food Chemistry* 129: 374-379.
- Kowalczyk, A., Biskup, I., and Fecka I. 2012. Total phenolic content and antioxidative properties of commercial tinctures obtained from some lamiaceae plants. *Natural Product Communications* 12: 1631-1634.
- Milan, S. 2011. Total Phenolic content, Flavonoid Concentration and Antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kargujevac Journal of the Sciences* 33: 63-72.
- Mirheidari, H. 1993. The Use the Plants in Prevention and Treatment of Diseases. Publication Islamic Cultural .535pp. (In Persian).
- Mokhtari, F., Hossin goli, A., and rahim malek, M. 2012. Evaluation of the possibility in using saffron petals as a source of natural antioxidant. 7<sup>th</sup> National Congress on Horticultural Sciences Iran. 2581-2584. (In Persian).
- Murugaian, P., Srikumar, R., and Thangaraj, R. 2009. Isolation and estimation of phytochemical content in aqueous and ethanolic extract of Piper betel. *Life Sciences and Bioinformatics* 1: 29-31.
- Norbaek, R., and Kondo, T. 2002. Flower Pigment Composition of Crocus species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochemical Systematic and Ecology Journal* 30 (8): 763-791.
- Omidi, A., Riahinia, N., Montazer Torbati, M., and Behdani, M.A. 2014. Hepatoprotective Effect of *Crocus sativus* (saffron) petals extract against Acetaminophen toxicity in male wistar rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 4 (5): 330-336. (In Persian).
- Rafiei, Z., Jafari, M., Aalami, M., and Khamiri, M. 2012. Antioxidant properties of olive leaf extract and its application in sunflower oil. *Journal of Food Research* 21 (1): 11-21.
- Schieber, A., stintzing, F.C., and Carle, R. 2001. By- product of plant food processing as a source of functional compounds recent developments. *Journal Trends in Food Science and Technology* 12 (11): 401-413.
- Temerdashev, Z.A., Frolova, N.A., and Kolychev, I.A. 2011. Determination of phenolic compounds in medicinal herbs by reversed phase HPLC. *Journal of Analytical Chemistry* 66 (4): 407-414.
- Thoo, Y.Y., Liang, J.Y., and Tan, C.P. 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry* 120: 290-295.
- Wojdyło, A., Oszmianski, J., and Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.
- Wong, C., Cheng, K., and Chen, F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry* 97: 705-711.
- Zargari, A. 1990. Medicinal Plants 4<sup>th</sup> edition, Tehran University Publishing. 924pp. (In Persian).

## Survey and comparison of the antioxidant activity, total phenolic, and flavonoid compounds of saffron petals sowing in different regions of the Lorestan province

*Ali Mohammadian<sup>1,2\*</sup>, Hassan Ahmadvand<sup>2</sup>, Reza Karamian<sup>3</sup>, Reza Siahmansour<sup>4</sup>, Ali Sepahvand<sup>5</sup> and Shahram Omidvari<sup>4</sup>*

Submitted: 13 February, 2016

Accepted: 19 May, 2016

Mohammadian, A., Ahmadvand, H., Karamian, R., Siahmansour, R., Sepahvand, A., and Omidvari, S. 2017. Survey and comparison of the antioxidant activity, total phenolic, and flavonoid compounds of saffron petals sowing in different regions of the Lorestan province. *Saffron Agronomy & Technology* 5(1): 51-60.

### Abstract

Saffron is one of the most valuable food and medicine products that has a high economic importance in Iran and other countries. Harmful environmental factors prohibit the human body from collating the free radicals that are produced during breathing resulting in problems such as premature aging, atherosclerosis and cancer. There has been only a few reported research studies on the antioxidant properties of Saffron petals in world. This research was carried out in order to survey the antioxidant compound that may be extracted from Saffron petals and indicate the total phenol content (TPC) and total flavonoid content (TFC) in the cultivated Saffron farms of the Lorestan province. After specifying the Saffron farms by the Random systematic method, the compound sampling was carried out (Saffron petals amount 2 kg). Then, the antioxidant activity, total amount of phenols and flavonoids in the extracts were measured by methods of DPPH, Folinciocalteau and Colorimetric assay, respectively. The results showed that the amount of IC<sub>50</sub> was the lowest and highest in Noorabad and Vician farms with amounts of 1.66 and 156.4µg/ml, respectively by the Duncan test. The results of mean comparison showed that the total phenol content and total flavonoid content of 1098.8 mg Gallic acid/g extract and 41.39 mg cou/g extract, respectively that belonged to the Noorabad and the Chaghalvandi farms had the highest amounts among all of the saffron cultivation in the farms.

**Keywords:** Natural antioxidants, Free radicals, Colorimetric assay, Planting of Saffron

1- Researcher, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad and 2.Researcher, Lorestan Agriculture and Natural Resources Research and Education center

2- Associate professor, department of biochemistry, faculty of medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Ira

3- Researcher, Lorestan Agriculture and Natural Resources Research and Education center

4- Assistant Professor, Lorestan Agriculture and Natural Resources Research and Education center

5- Researcher, Lorestan Agriculture and Natural Resources Research and Education center

(\*- Corresponding author Email: mohammadian53@yahoo.com)

DOI: 10.22048/jsat.2017.39231