نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)

جلد چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۵

شماره صفحه: ۱۵۸-۱۴۹

بررسی کمی و کیفی عوامل فیتوشیمیایی ضایعات زعفران (*Crocus sativus* L.) و اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین با استفاده از امواج فرا صوت

قدسیه باقرزاده[1*] و مریم منظری توکلی[2]

۱- استادیار آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی آلی،گروه شیمی، دانشگاه بیرجند

۲-دانشجوی گرایش فیتوشیمی آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی آلی،گروه شیمی، دانشگاه بیرجند

*نویسنده مسئول: E-mail: ghbagherzade@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۲

چکیده

زعفران ادویه‌ای است که از گل‌های گیاه *Crocus sativus* L. بدست می‌آید و به عنوان یکی از ارزشمندترین گیاهان دارویی شناخته شده است. در این تحقیق استخراج عصاره از گلبرگ و پرچم گیاه زعفران با روش خیساندن و استفاده از امواج فرا صوت با سه حلال آب، اتانول و متانول انجام شد. ابتدا تست‌های کیفی ترکیبات طبیعی بر روی عصاره‌ها انجام شد، سپس میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئید و تانن عصاره‌ها به ترتیب با کاربرد روش‌های فولین فنل شیکالتو،کلرید آلومینیوم و pvp تعیین شدند. همچنین با استفاده از روش اسپکتروفتومتری میزان آنتوسیانین در پرچم و گلبرگ خشک و منجمد شده زعفران تعیین گردید. اندازه‌گیری عناصر معدنی موجود در گیاه توسط دستگاه جذب و نشر اتمی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. حضور ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها، استروئیدها، فیتو استرول‌ها، کربوهیدرات‌ها و تانن‌ها تایید گردید. معین شد که استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و تانن در حضور آب نسبت به سایر حلال‌ها از راندمان بالاتری برخوردار می‌باشد و همچنین میزان آنتوسیانین‌ها در نمونه منجمد شده و در حضور حلال اتانول زیادتر از نمونه خشک شده می‌باشد. همچنین نشان داده شد که بالاترین مقدار عنصر معدنی مربوط به عنصر پتاسیم وکمترین مقدار مربوط به عنصر منگنز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، تانن، ضایعات زعفران، عناصر معدنی، محتوای فنل.

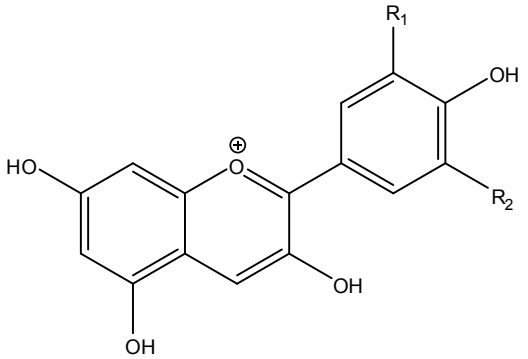
مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چند ساله از خانواده زنبق است. ارتفاع آن ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر می‌باشد. از وسط بنه، تعدادی برگ باریک خارج گردیده و از وسط برگ‌ها، ساقه گلدار خارج می‌شود که سرانجام به یک تا سه گل منتهی می‌شود. گل‌ها دارای ۶ گلبرگ بنفش رنگ هستند، ۳ تا از این گلبرگ‌ها پیرامون خارجی کاسبرگ و ۳ گلبرگ دیگر در بخش داخلی قرار داشته که در بعضی گونه‌ها به رنگ ارغوانی می‌باشند (شکل ۱). گل‌ها دارای ۳ پرچم و یک مادگی منتهی به کلاله‌ی سه شاخه به رنگ قرمز متمایل به نارنجی هستند. قسمت مورد استفاده این گیاه، انتهای خامه و کلاله سه شاخه است که به نام زعفران مشهور است و دارای بوی معطر با طعم کمی تلخ می‌باشد (Zargari, 1981). در طی چند دهه‌ی گذشته در بین جوامع بشری استفاده از گیاهان با کاربردهای مختلف از قبیل دارویی و صنعتی رشد روز افزونی داشته است. رویکرد درمان از طریق گیاهان و کاربردهای آن‌ها بعد از روشن شدن مضرات داروهای شیمیایی به طور چشمگیری افزایش پیدا کرده است (Balayssac et al., 2009). حدود ۸۰-۷۵ درصد مردم جهان مخصوصا در کشورهای در حال توسعه برای درمان اولیه‌ی بیماری‌ها از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند چرا که اغلب معتقد هستند تهیه‌ی داروهای گیاهی راحت‌تر است و از طرف دیگر عوارض جانبی کمتری دارند (Pal & Shukla, 2003). داروهای گیاهی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند که در این بین *Crocus sativus* در زمره مهم‌ترین داروهای گیاهی است (Arirudran et al., 2014).

شکل ۱. گیاه زعفران

Fig.1. Saffron plant

بر طبق آزمایش‌های انجام شده روی حیوانات، زعفران و اجزای تشکیل دهنده‌ی آن در جلوگیری و درمان سرطان، کاهش سطح کلسترول خون، کاهش اثرات جانبی داروهای سیس پلاتین و افزایش عملکرد مغز نقش به‌سزایی دارد (Champalal et al., 2011). رنگ گلبرگ زعفران به علت وجود ترکیباتی به نام آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها است. آنتوسیانین‌ها دسته‌ای از ترکیبات طبیعی و در گروه متابولیت‌های ثانویه و متعلق به خانواده فلاونوئیدها می‌باشند (Erlei et al., 2014). آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها ایجاد کننده رنگ‌های قرمز، بنفش و آبی در بسیاری از گل‌ها، میوه‌ها و سبزیجات هستند. این ترکیبات به دلیل دارا بودن خواص بیولوژیکی منحصر به فرد از نظر دارویی قابل ملاحظه بوده (Nickhah et al., 2010) و همچنین دارای بوی معطر و طعم کمی تلخ می‌باشند (Zargari, 1981). زعفران دارای رنگ، طعم و عطر خاصی بوده که هر یک از این خصیصه‌ها مربوط به یک دسته از ترکیبات تشکیل دهنده آن می‌باشد که تاکنون برخی از آن‌ها شناخته شده است، به علاوه زعفران دارای مقادیری مواد معدنی، آب و ویتامین است. زعفران حاوی بیشتر از ۱۵۰ ماده‌ی فرار و معطر بوده و همچنین تعدادی ترکیبات غیر فرار مثل کارتنوئید، زانتین، لیکوپن و کاروتن‌های آلفا و بتا از زعفران جدا شده‌اند (Champalal et al., 2011).



شکل ۲. ساختار شیمیایی آنتوسیانین‌ها

Fig. 2. Chemical structure of anthocyanins

Petunidin $R_{1=}OH$ $R_{2=}OCH_3$
Malvidin $R_{1=}OCH_3$ $R_{2=}OCH_3$

فلاونول‌هایی نظیر کائمفرول[1] و ایزورامنتین[2] و آنتوسیانین‌هایی نظیر دلفینیدین[3] و پتونیدین[4] از ضایعات زعفران جداسازی شده است (Goupy et al., 2013).

در این مطالعه، به بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و فیتوشیمیایی ضایعات زعفران و محتوای فنل، فلاونوئید و تانن گیاه پرداخته شده و همچنین میزان آنتوسیانین در نمونه‌های خشک و منجمد شده آن مورد اندازه‌گیری و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و آماده سازی گیاه:

ضایعات زعفران در آبان ماه سال ۱۳۹۳از مزرعه ای واقع در ۷۵ کیلومتری جنوب بیرجند (32°24'06.7"N 59°16'53.5"E) جمع آوری گردید. بخشی از نمونه‌ها در دمای ۱۵-°C نگهداری شدند. بقیه در سایه و دور از نور خورشید در اتاقی با تهویه مناسب خشک گردید. جهت انجام بررسی‌های فیزیکوشیمیایی، از نمونه‌های خشک استفاده گردید.

بررسی فیزیکوشیمیایی:

میزان رطوبت (Chopra & Kanwar, 1991) و خاکستر کل با روش وزن سنجی اندازه‌گیری شدند (API, 2007; HPI, 2002).

اندازه‌گیری عناصر معدنی:

۳ گرم نمونه، به مدت ۸ ساعت در کوره با دمای ۵۵۰°C قرار داده شد. خاکستر بدست آمده جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. به خاکستر به دست آمده ۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۱ نرمال اضافه و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس محلول حاصل به حجم معین رسانده و آنگاه محلول‌های استاندارد تهیه گردید. در مرحله نهایی میزان عناصر معدنی با استفاده از دستگاه جذب اتمی (AA-6300 Shimadzu) اندازه‌گیری شد (Alabi & Alausa, 2006).

1- Kaempferol
2 - Isorhamnetin
3 - Delphinidin
4 - Petunidin

بررسی فیتو شیمیایی:

جهت انجام تست‌های کیفی، به صورت جداگانه عصاره‌های متانولی و اتانولی و آبی از گلبرگ و پرچم منجمد شده تهیه شدند به این ترتیب که به مقدار مشخص از نمونه‌ها حلال اضافه و به روش خیساندن[5] و در زمان ۲۴ ساعت عصاره‌گیری انجام شد.

برای اطمینان از آزاد شدن تمام ترکیبات به درون حلال، به مدت یک ساعت نمونه‌ها در معرض امواج فرا صوت قرار گرفتند. زمان بهینه برای این عمل از طریق مقایسه چند نمونه در معرض امواج قرار گرفته و مقایسه آن‌ها از نظر مواد تشکیل دهنده بدست آمد. (مشخصات دستگاه استفاده شده:

:BANDELIN SONOREX DIGITEC.Type: DT 255 H SN: 3240. 00065150.020 HF-Frequenz: 35 KHZ)

سپس عصاره‌ها صاف شده و برای انجام تست‌های کیفی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Stanković, 2011).

تست کیفی ترکیبات طبیعی:

در این بخش وجود چند دسته از ترکیبات مهم گیاهی مانند آلکالوئید، فنل، تانن، آنتوسیانین، پروتئین، اسید آمینه، استروئید، کومارین، فیتواسترول، کربوهیدرات و ساپونین موردبررسی قرار گرفت (جدول شماره ۲).

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:

از آنجایی که آب حلالی قطبی، ارزان و از نظر زیست محیطی ایمن است لذا استفاده‌ی آن برای جداسازی دسته‌ای از ترکیبات قطبی بسیار مؤثر است (Prior et al., 2005). در این تحقیق از حلال‌های اتانولل و آب استفاده شده است. برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره، محلول استاندارد ppm ۱۰۰۰ گالیک اسید تهیه شد. سپس محلول‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ppm ۹۰ از محلول ppm ۱۰۰۰ تهیه شد. برای اندازه‌گیری مقدار فنل ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره یا استاندارد، ۲ میلی‌لیتر محلول فولین فنل شیکالتو ۵/. مولار و ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد را با هم مخلوط کرده و در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و بعد از یک ساعت

5- Maceration

جذب نمونه‌ها در ۷۶۰ nm قرائت شد. با استفاده از جذب نمونه‌های استاندارد منحنی کالیبراسیون رسم شد و توسط معادله خط بدست آمده غلظت ترکیبات فنلی در عصاره‌ها محاسبه شد (Stanković, 2011).

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره:

برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره، محلول استاندارد روتین ۱۰۰۰ ppm تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر عصاره با محلول استاندارد و ۱ میلی‌لیتر محلول کلرید آلومینیوم ۲ درصد را با هم مخلوط کرده، بعد از گذشت ۴۰ دقیقه جذب محلول‌ها در حضور شاهد در طول موج ۴۵۰ nm قرائت شد. با استفاده از جذب محلول‌های استاندارد منحنی کالیبراسیون رسم شد و بر اساس معادله خط بدست آمده غلظت فلاونوئیدها در عصاره اندازه‌گیری شد (Quettier et al., 2000) .

اندازه‌گیری مقدار تانن:

ابتدا مقدار ترکیبات فنلی کل مطابق روش گفته شده در اندازه‌گیری ترکیبات فنلی محاسبه شد با این تفاوت که از استاندارد تانیک اسید استفاده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ nm قرائت شد و سپس برای محاسبه ترکیبات فنلی بدون تانن ۰/۱ گرم pvp[1]، ۱ میلی‌لیتر عصاره و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و نمونه‌ها را ۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ کرده ومحلول شفاف را جدا و جذب نمونه‌ها در ۷۲۵ nm قرائت شد. کل تانن قابل استخراج از تفاوت ترکیبات فنلی قبل و بعد از اضافه کردن pvp محاسبه شد (Makkar et al., 1993).

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین در نمونه‌های خشک و منجمد شده:

جهت بررسی میزان آنتوسیانین در نمونه‌های خشک و منجمد شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. به این ترتیب که عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی از نمونه‌های خشک و منجمد شده به روش خیساندن و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط تهیه و سپس صاف شدند. این آزمایش شامل دو مرحله بود در مرحله اول بهترین حلال برای استخراج انتخاب و سپس در مرحله دوم مقدار آنتوسیانین در نمونه خشک و منجمد تعیین شد. برای این منظور ۳ میلی‌لیتر عصاره آماده شده به ۳ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک ۱ درصد اضافه و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۸ nm قرائت شد و میزان آنتوسیانین از رابطه زیر محاسبه شد (Ivanovic et al., 2014).

$$TAC(g/100\ g) = \frac{A.5000}{718.m}$$

TAC مقدار آنتوسیانین کل، A جذب نمونه‌ها در ۵۲۸ نانومتر و m مقدار گرم گیاه استفاده شده می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی‌های فیزیکوشیمیایی:

میزان رطوبت و خاکستر به ترتیب ۰/۱ و ۱/۶۰ (%w/w) تعیین شد. مقدار خاکستر کل نشان دهنده‌ی حضور ترکیبات معدنی می‌باشد. در این تحقیق اندازه‌گیری عناصر معدنی موجود در گیاه توسط دستگاه جذب و نشر اتمی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). همانطور که در جدول آورده شده است، پتاسیم فراوانترین عنصر معدنی در گلبرگ و پرچم است که بیشترین مقدار آن مربوط به گلبرگ (۷۲۱/۶۱ ppm) است. این عنصر جزو عناصر درشت مغذی بوده و کوفاکتور تعداد زیادی از آنزیم‌ها، به خصوص آنزیم‌های شرکت کننده در فتوسنتز و تنفس است. منگنز، در مقایسه با سایر عناصر کمترین میزان را به خود اختصاص داده است که مقدار آن در پرچم (۰/۰۲ ppm) نسبت به گلبرگ (۰/۰۴۳) کمتر است. منگنز کوفاکتور تعدادی از آنزیم‌ها نظیر دهیدروژنازها و دکربوکسیلازها است که در چرخه تنفسی کربن نقش حیاتی دارند. منگنز در زمره‌ی عناصر ریزمغذی است. در تحقیقی که توسط سان و همکارانش در سال ۲۰۱۲ جهت تعیین عناصر معدنی در گیاه زعفران انجام شد، میزان عناصر معدنی در کلاله زعفران تعیین وگزارش گردید که بیشترین میزان عناصر معدنی مربوط به یون‌های پتاسیم و سدیم (۷۶۶/۴۹ ppm) می‌باشد، این گزارش نشان دهنده‌ی این است که میزان عنصر پتاسیم در کلاله و ضایعات زعفران تقریباً شبیه هم بوده و کمترین آن مربوط به یونهای روی (۲۱۳/۸۵ ppm) و گوگرد (۱۸۱/۹۷ ppm) می‌باشد و میزان یون منگنز در این مطالعه ۲۵۷/۶۱ ppm بود که نسبت به یون پتاسیم

1-Polyvinylpyrrolidone

کمتر است (Sun et al., 2012). آزمون‌های کیفی بر روی شش عصاره‌ی اتانولی، متانولی و آبی از گلبرگ و پرچم به صورت جداگانه صورت گرفت. با این آزمون‌ها حضور ترکیبات فنلی، آنتوسیانین، استروئید، تانن، فیتواسترول و کربوهیدرات اثبات شدند (جدول ۲). برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی از معرف فولین فنل شیکالتو استفاده شد. در محیط قلیایی، فنل‌ها به طور کامل یونیزه می‌شوند و هنگامی که معرف فولین به محلول محتوی فنل یونیزه شونده اضافه می‌شود، یک واکنش اکسیداسیون صورت گرفته و فنل اکسید می‌شود. معرف فولین زرد رنگ است و پس از انجام فرآیند اکسیداسیون آبی رنگ می‌گردد. شدت تغییر رنگ به میزان ترکیبات فنلی کل در عصاره بستگی دارد. ترکیبات فنلی از بهترین منابع آنتی اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند که اغلب دارای ساختار قطبی هستند اما در دسته‌ای از آن‌ها به علت اتصال گروه‌های غیر قطبی به مولکول، اندکی از قطبیت آن‌ها کاسته می‌شود. لذا برای جداسازی آن‌ها از بافت گیاهی، استفاده از حلال‌های با قطبیت متفاوت بسیار مؤثر است.

همانطور که در جدول ۳ نیز مشخص است بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی مربوط به مخلوط گلبرگ و پرچم در حلال آب می‌باشد. در مقایسه با تحقیقی که توسط گلی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ به منظور اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گلبرگ‌های زعفران انجام شد، میزان ترکیبات فنلی گلبرگ زعفران در حلال متانول را (۳/۴۲ mg/g) گزارش کردند، میزان ترکیبات فنلی گزارش شده در این مطالعه در حلال آب ۸/۱۴۹ mg/g و اتانول ۸/۵۸ mg/g بود (Goli et al., 2012).

همچنین در تحقیقی که توسط کریمی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ به منظور سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی زعفران انجام شد، میزان ترکیبات فنلی در کلاله زعفران را در دو حلال آب ۵/۷ mg/g و اتانول ۶/۳mg/g گزارش کرده‌اند، بر این اساس میزان ترکیبات فنلی در ضایعات زعفران نیز بیشتر از کلاله بوده است (Karimi et al., 2010). انتظار می‌رود این تفاوت مقدار به دلیل استفاده از نمونه‌ی منجمد شده به جای نمونه‌ی خشک و همچنین استخراج به کمک امواج فرا صوت باشد (Goli et al, 2012). چون در استخراج به کمک امواج فرا صوت بافت سلول گیاهی از هم پاشیده شده و کلیه محتویات سلولی در تماس با حلال قرار می‌گیرند. همچنین بر طبق تحقیقات آکار و همکارانش که میزان ترکیبات فنلی بین سه گونه‌ی *Crocus baytopiorum* B.Mathew (۳۲mg/g)، *Crocus flavus* Haw. (۵۰mg/g) و *Crocus biflorus* Mill. (۲۰mg/g) مورد بررسی قرار گرفته است نشان دهنده این است که بیشترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به گونه‌ی *C. flavus* Haw. و کمترین میزان آن مربوط به گونه‌ی مورد مطالعه C. sa*tivus* L. که همان زعفران است، می‌باشد (Acar et al, 2010).

جدول ۱. عناصر معدنی در گلبرگ و پرچم (ppm)

Table 1. Mineral elements in petals and stamen (ppm)

نمونه‌ها (Samples)	منیزیم Mg	کلسیم Ca	آهن Fe	منگنز Mn	پتاسیم K	سدیم Na	روی Zn
گلبرگ (Petal)	22.94	3.65	35.61	0.04	721.61	45.82	0.54
پرچم (Stamen)	9.06	0.89	16.87	0.02	315.02	45.38	0.33

جدول ۲. آزمون‌های کیفی عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی

Table 2. Preliminary phytochemical screening of ethanolic, methanolic and aqueous extract

آبی پرچم Stamens Aquatic	متانولی پرچم Stamens Methanolic	اتانولی پرچم Stamens Ethanolic	آبی گلبرگ Petals Aquatic	متانولی گلبرگ Petals Methanolic	اتانولی گلبرگ Petals Ethanolic	تست فیتوشیمیایی Phytochemical test
-	-	-	-	-	-	آلکالوئید Alkaloids
+++	+	+	+++	+	+	فنل Phenols
++	+++	+++	++	+++	++++	آنتوسیانین Anthocyanins
-	-	-	-	-	-	پروتئین Protein
-	-	-	-	-	-	اسید آمینه Amino acid
-	-	-	+	+	+	استروئید Steroids
-	-	-	-	-	-	کومارین Couumarins
+	+	+	+	+	+	فیتواسترول phytosterol
-	-	-	-	-	-	ساپونین Saponins
+	+	+	+	+	+	کربوهیدرات Carbohydrate
+	+	+	+	+	+	تانن Tannin

جدول ۳. میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و تانن اندازه‌گیری شده با روش اسپکتروفتومتری (mg/g)

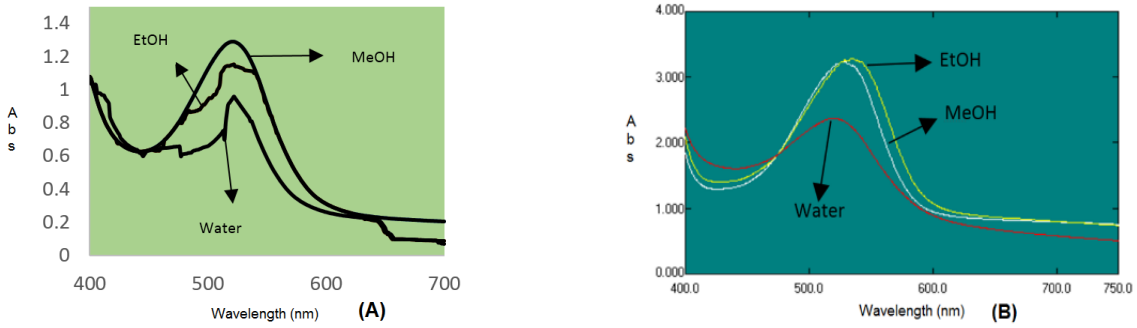
Table 3. The amount of phenolic, flavonoid and tannin compounds determined by spectrophotometric method (mg/g)

آبی مخلوط Mixed aquatic	اتانولی مخلوط Mixed Ethanolic	آبی پرچم Stamens aquatic	اتانولی پرچم Stamens Ethanolic	آبی کلبرگ Petals aquatic	اتانولی گلبرگ Petals Ethanolic	عصاره Extract
8.727	7.375	8.104	8.058	8.149	8.058	ترکیبات فنلی Phenolic compounds
5.474	5.341	4.808	4.738	4.808	4.734	ترکیبات فلاونوئیدی Flavonoid compounds
3.271	3.180	1.413	1.412	1.772	1.711	تانن Tannin

استاکوویک و همکاران عصاره آبی و متانولی قسمت‌های مختلف گیاه سیزاب کوهستان را از نظر محتوی فنلی و فلاونوئیدی بررسی نموده و به این نتیجه رسیدند که محتوی فنلی و فلاونوئیدی عصاره آبی بیشتر از عصاره‌ی متانولی است که نشان دهنده نقش مؤثرتر آب نسبت به سایر حلال‌ها می‌باشد (Stankovic., 2011). نتایج به دست آمده در ارتباط با میزان ترکیبات فلاونوییدی با استفاده از دو حلال اتانول و آب نشان می‌دهد که میزان ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده توسط حلال آب ۵/۴۷۴ mg/g و حلال اتانول ۵/۳۴۱ mg/g است، در حالیکه میزان ترکیبات فلاونوئیدی اندازه‌گیری شده در کلاله زعفران توسط کریمی و همکارانش برای حلال آب ۳/۸ mg/g و اتانول ۲/۹ mg/g گزارش شده است که نسبت به مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی اندازه‌گیری شده برای ضایعات زعفران در این تحقیق کمتر است اما میزان استخراج آن در آب بیشتر از اتانول صورت گرفته است. مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و آنچه توسط کریمی و همکاران گزارش شده است نشان می‌دهد که حلال آب برای استخراج، حلالی کارآمد بوده اما اختلاف در میزان فلاونوئیدهای تحقیق حاضر احتمالاً به علت استفاده از امواج فرا صوت می‌باشد که از این طریق بافت پارانشیمی گیاه و سلول‌های آن بهتر تخریب شده و خروج کامل مواد متشکله از آن‌ها را به حلال بهتر امکان‌پذیر می‌سازد. این امر باعث گردیده که استخراج در مقایسه با روش معمولی از راندمان بالاتری برخوردار باشد. دلیل بعدی این اختلاف ممکن است ناشی از شرایط آب و هوایی و خاک مناطق مورد تحقیق باشد که خود تأثیر به سزایی در میزان تکوین متابولیت‌های ثانویه گیاه از قبیل ترکیبات فنلی دارد. بر اساس نتایج به دست آمده از آکار و همکارانش در سال ۲۰۱۰، میزان ترکیبات فلاونوئیدی سه گونه‌ی مختلف *Crocus baytopiorum* B. Mathew ۳۶ mg/g، *Crocus flavus* Haw. ۷۱ mg/g و *Crocus biflorus* Mill. ۳۲ mg/g گزارش شد که بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی مربوط به گونه‌ی *C. flavus* How. بود که در مقایسه با گونه مورد مطالعه در این تحقیق (*C. sativus* L.) از مقدار فلاونوئید بالاتری برخوردار می‌باشد از دو حلال اتانول و آب جهت استخراج تانن استفاده شد همانطور که در جدول ۳ نیز مشخص است بیشترین مقدار تانن استخراج شده مربوط به حلال آب است.

بررسی میزان آنتوسیانین در نمونه‌های خشک و منجمد شده:

طیف UV-Visible نمونه ضایعات زعفران منجمد شده و خشک شده در سه حلال آب، اتانول و متانول گرفته شد (شکل۲). همانطور که در این شکل مشخص است در ناحیه ۵۲۸ nm یک جذب قوی که نشان دهنده حضور آنتوسیانین‌ها می‌باشد، مشاهده می‌گردد. بر این اساس مشخص شد که میزان آنتوسیانین استخراج شده در نمونه‌ی منجمد شده در حضور حلال اتانول ($۱۱/۵۲\frac{g}{۱۰۰g}$) بیشترین مقدار را دارد. نتایج حاصل از جذب بر روی نمونه‌های خشک و منجمد شده نشان داد که بیشترین مقدار آنتوسیانین استخراج شده در حضور حلال اتانول و مربوط به نمونه‌های زعفران منجمد شده است. علت این امر به ساختمان شیمیایی آنتوسیانین‌ها ارتباط دارد. این ترکیبات در مقابل نور، حرارت و رطوبت ناپایدار بوده و تجزیه می‌گردند. اما در نمونه منجمد شده آنتوسیانین‌ها پایدارتر بوده و بهتر حفظ می‌گردند.



شکل ۳. (الف) طیف اسپکتروفتومتری مرئی نمونه‌های خشک شده درحلال‌های متانول، اتانول و آب و (ب) طیف اسپکتروفتومتری مرئی نمونه‌های منجمد شده درحلال‌های متانول، اتانول و آب

Fig. 3. (A) Visible spectrum of dried samples in MeOH, EtOH and Water and (B) Visible spectrum of frozen samples in MeOH, EtOH and Water

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیشترین مقدار یون معدنی در گیاه مربوط به یون پتاسیم در گلبرگ و کمترین مقدار یون معدنی مربوط به یون منگنز در پرچم می‌باشد. همچنین بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و تانن مربوط به حلال آب است، چرا که ترکیبات بسیار قطبی تاکنون از ضایعات زعفران شناسایی شده‌اند. همچنین بیشترین مقدار آنتوسیانین در ضایعات زعفران توسط حلال اتانول و از نمونه‌های منجمد شده استخراج شد.

تشکر و قدردانی

مراتب تقدیر و تشکر را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بیرجند و مدیر گروه پژوهشی زعفران جناب آقای دکتر بهدانی که با کمک‌های مالی و راهنمایی‌های ارزشمند خود امکان پیشبرد هر چه بهتر انجام تحقیقات در زمینه زعفران، این گیاه بومی منطقه خراسان جنوبی را هموارتر می‌سازند اعلام می‌دارد.

منابع

Behnia, M., 1991. Saffron Botany cultivation & Production. University of Tehran publication. 24 p. [In Persian].

Champalal, k.D., Nilakshi, N., Vijay, G.R., 2011. Detailed profile of *Crocus sativus.* International.Int J Pharm. Bio. Sci.2 (1), 530-540.

Chopra, S.L., Kanwar, J.S., 1991. In Analytical Agricultural Chemistry. Kalyani Publications, New Delhi. 5, 297 p.

Erlei, W., Yongguang, Y., Caina, X., jingbo, L., 2014. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers fromblueberries using combined chromatographic techniques. J. Chromatogr. A.1327, 39-48.

Goli, S.A.H., Mokhtari, F., Rahimmalek, M., 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus*L.) Petal. J. Agr. Sci.4 (10), 175-181.

Goupy, P., AbertVian, M., Chemat, F., Caris-Veyrat, C., 2013. Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of Crocus sativus by

Acar, G., MercanDogan, N., Emin Duru, M., Kıvrak, I., 2010. Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant activityof the various extracts of *Crocus* species in Anatolia. Afr. J. Microbiol. Res. 4 (11), 1154-1161.

Alabi, D.A., Alausa, A.A., 2006. Evaluation of the Mineral Nutrients and Organic Food Contents of the Seeds of *Lablab purpureus*, *Leucaena leuco cephala* and *Mucunautilis* for Domestic Consumption and Industrial Utilization. J. WJAS. 2 (1), 115-118.

Arirudran, B., Thenmozhi, A., Priyadharshini, P., 2014. Evaluation of preliminary phytochemicals and antioxidant efficacy of *Crocus sativus* L. J. IJPRD. 5 (12), 1-8.

Balayssac, S., Tref, S., Gilard, V., Malet-Martino, M., Martino, M., Delsuc, M.A., 2009. 2D and 3D DOSY 1H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: Application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. J. Pharm. Biomed. Anal. 50, 602–612.

ultra-performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. J. Ind Crops Prod. 44, 496– 510.

Hopkins, W .G. 2008. Introduction to Plant Physiology. University of Western Ontario.

Herbal Pharmacopoeia of India, **2002**. Revised new edition, Indian Drug Manufacturers Association, Mumbai. 129 p.

Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., 2014. Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonicextract from blackberry cultivar "˘Ca˘canskaBestrna. J. Ind Crops Prod.53, 274-281.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Z.E. Jaafar, H., 2010. Evaluation of *Crocus sativus*L. Stigma Phenolic and FlavonoidCompounds and Its Antioxidant Activity. J. Molecules, 15, 6244-6256.

Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Borowy, N.K., Becker, K., 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agr.* 61,161–165.

Nickhah, E., Khayami, M., Heydari, R., 2010. Effect of some chemicals on stability of anthocyanins from blackberry (Morusnigra). 25 (1), 32-43. [In Persian with English summary].

Pal, S.K., Shukla, Y., 2003. Herbal Medicine: Current Status and the Future. Asian Pac. J. Cancer Prev. 4, 281-288.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 53(8), 3101–3113.

Quettier, D., Gressier, B. Vasseur., J. Dine., T. Brunet., C. Luyckx., M. Cayin., J. Bailleul, F., Trotin, F., 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. J. Ethnopharmacol. 72(1-2), 35-42.

Sun, J., Zheng, M., Wei, Y., Zhang, P., Geng, W., 2012. Determination of Mineral Elements in *Crocus Sativus*L.by the Method of Microwave Digestion and ICP-OES. ICBEB . 138-140.

Stankovic, M.S., 2011. Total Phenolic Content, Flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. Kragujevac J. Sci. 33, 63-72.

The Ayurvedic Pharmacopoeia of India, 2007. Government of India, Ministry of Health and Family Welfare, Department of Ayurveda, Yoga and Naturopathy, Unani, Siddha and Homeopathy (AYUSH), New Delhi. Part-I, Vol.II, 169 p.

Zargari, A., 1981. Medicinal Plants. University of Tehran Publication. 574 p. [In Persian].

Journal of Saffron Research (semi-annual)

Vol.4, No.2, Fall & Winter, 2016-2017

p. 149-158

Birjand University

Qualitative and Quantitative Investigation of Phytochemical Factors of Wastage of *CrocusSativus* L. and Determination of Anthocyanin Content using Ultrasound Waves

Ghodsieh Bagherzade*[1] and Maryam Manzaritavakoli[2]

1- Assistant of Organic Chemistry Research Laboratory, University of Birjand.

2- Phytochemistry Student Research Laboratory of Organic Chemistry, University of Birjand

*Corresponding author E-mail: ghbagherzade@birjand.ac.ir

Received 1 December 2014; Accepted 12 May 2015

Abstract

Saffron is a spice derived from the flowers of *Crocus Sativus* L. and it is known as one of the most valuable medicinal plants worldwide. In this study, the extract of petal and stamen were obtained from saffron wastages with methods of maceration and ultrasonic with water, ethanol and methanol as solvent. First, phytochemical screening of natural compounds was investigated. Then the content of phenolic compounds, flavonoids and tannins were measured, respectively, with the Folin-Ciocalteu, Aluminum chloride and PVP methods. Mineral elements of plant were compared by atomic absorption and emission. The existence of phenolic compounds, Anthocyanins, steroids, tannins, phytoestrol and carbohydrates in the saffron waste were confirmed using qualitative measures. Our results clearly indicated that the extraction of phenolic compounds, flavonoids and tannins using water as the solvent is more effective than the use of other solvents. Moreover, the amount of anthocyanin in frozen sample was more than dried sample in situ of ethanol as solvent. It was shown that potassium had the maximum amount of mineral element, while manganese had the minimum amount of mineral element in petal and stamen of saffron.

Keywords: Anthocyanin, Mineral element, Phenolic content, Saffron waste, Tannin