

بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی عصاره آبی گلبرگ زعفران (*Crocus sativus L.*) و کاربرد آن در سنتز نانوذرات نقره

محمدعلی ناصری<sup>۱\*</sup>، ندا سلیمانی<sup>۲</sup> و علی اله‌رسانی<sup>۳</sup>

۱- استاد، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیتوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند

۳- استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند

\*نویسنده مسئول: Email: manaseri@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۳

#### چکیده

سنتز سبز نانوذرات فلزی با اندازه ۱۰۰-۱ نانومتر مورد توجه زیادی قرار گرفته است. این نانوذرات کاربردهای فراوانی در شاخه‌های مختلف علوم و تکنولوژی دارند. در این پژوهش، عصاره آبی گلبرگ زعفران استخراج گردید و در سنتز نانو ذرات نقره مورد استفاده قرار گرفت. نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از تکنیک‌های مختلف (طیف سنجی ماورای بنفش/مرئی، زیر قرمز، تصویر برداری با میکروسکوپ الکترونی و اشعه ایکس) شناسایی شدند. اندازه نانوذرات سنتزی با استفاده از نمودار اشعه ایکس تعیین گردید (۱۸ نانومتر). تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی نیز اندازه ذرات را حدود ۱۸ نانومتر نشان داد که نتایج بدست آمده از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی با نمودار اشعه ایکس همخوانی کامل دارد. همچنین، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره آبی گلبرگ زعفران با استفاده از حلال‌های مختلف با قطبیت متفاوت (اتانول، متانول، اتیل استات و کلروفرم) استخراج گردید. نتایج نشان داد، عصاره متانولی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی ( $87.6 \times 10^{-3} \text{ mg/g}$ ) و عصاره اتانولی بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی ( $32.68 \times 10^{-3} \text{ mg/g}$ ) را دارا می‌باشد و کمترین مقدار آنها در کلروفرم ( $14.08 \times 10^{-3}$  و  $2.07 \times 10^{-3}$  به ترتیب برای فنل و فلاونوئید) استخراج می‌شود. همچنین، توانایی مهار رادیکالهای آزاد ۲ و ۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) در عصاره متانولی گلبرگ و پرچم زعفران ( $IC_{50}$ ) به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد عصاره متانولی گلبرگ زعفران خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره متانولی پرچم زعفران دارد ( $IC_{50}$  برای گلبرگ و پرچم زعفران بترتیب برابر با ۵/۹ و ۱۴/۷۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است).

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، گلبرگ زعفران، نانو ذرات نقره.

## مقدمه

در دهه اخیر، فناوری نانو در علوم مختلف از جمله فیزیک، شیمی، علم مواد و زیست‌شناسی پیشرفت بسیاری کرده است (Liang et al., 2014). سنتز نانوذرات فلزی به روش‌های مختلف از جمله روش‌های شیمیایی و بیوسنتزی انجام می‌شود (Valli & Vaseeharan, 2012). در سنتز نانوذرات فلزی به روش شیمیایی از مواد شیمیایی و سرطان‌زا مانند تیوفنل، استات جیوه و تیواوره استفاده می‌گردد که علاوه بر هزینه بالای مواد شیمیایی مورد استفاده، اثرات مخربی بر محیط زیست و سلامت انسان بدنبال دارد (Bar et al., 2010; Vinod et al., 2011).

بنابراین دانشمندان در پی یافتن روش‌های سنتزی سبز و کم هزینه برای سنتز نانوذرات در مقیاس وسیع می‌باشند (Sathishkumar et al., 2009). عصاره‌های گیاهی، منابع غنی از انواع متابولیت‌های ثانویه از جمله مشتقات ترکیبات فنلی، تریپنوییدها، آلکالوئیدها و ... می‌باشند. این ترکیبات، دارای گروه‌های عاملی مختلفی از جمله گروه‌های هیدروکسیل، کتون، آلدید، فنلی، اسیدی و ... هستند که بسیاری از آن‌ها پتانسیل الکترون دهنده‌گی دارند و قادر به احیای یون‌های فلزی هستند (Prasain et al., 2004). کاربرد عصاره‌های گیاهی در سنتز نانوذرات مختلف به عنوان یک روش سبز و سازگار با محیط در حال توسعه است. در سال‌های اخیر، پژوهشگران از عصاره‌ی گیاهان مختلفی از جمله کاسنی، نعناع، گشنیز، حنا، چای و... برای سنتز نانو ذرات نقره استفاده کرده‌اند (Dwivedi & Gopal., 2010).

ترکیبات فنولی به علت دارا بودن خواص ضد سرطانی و ضد جهشی مورد توجه ویژه محققان قرار گرفته‌اند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در گیاهان عمدتاً به دلیل توانایی اکسایش-کاهش و ساختار شیمیایی آن‌ها می‌باشد. بنابراین، ترکیبات فنولی نقش مهمی در خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، احاطه کردن فلزات انتقالی و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق تغییر مکان یا تجزیه این ترکیبات دارا می‌باشند (Fazli et al., 2013).

زعفران با نام علمی *Crocus sativus L.* متعلق به خانواده زنبق است (Baghai & Maleki, 2014). Farahani., 2014) زعفران گیاهی بسیار ارزشمند

است که به طلای سرخ مشهور شده است. این گیاه در صنایع دارویی، رنگرزی پارچه و الیاف و در صنایع غذایی به عنوان رنگ و چاشنی کاربردهای فراوانی دارد (Hadizadeh et al., 2010; Naviglio et al., 2010) متاسفانه، در کشور ما تنها از کلالة زعفران استفاده می‌شود و بقیه قسمت‌های آن (گلبرگ و پرچم) به عنوان ضایعات کشاورزی محسوب شده و علیرغم حجم زیاد تولید، مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. لذا در این پژوهش، عصاره آبی گلبرگ زعفران در سنتز نانوذرات نقره به عنوان عامل احیا کننده و پایدار کننده به روش هم‌رسوبی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## جمع آوری گیاه:

گلبرگ زعفران در آبان ماه ۱۳۹۲ از زمین‌های زراعی اطراف شهرستان بیرجند که در ۵۹ درجه و ۱۳ دقیقه طول جغرافیایی و ۳۲ درجه و ۵۳ دقیقه عرض جغرافیایی و در ارتفاع ۱۴۹۱ متری از سطح دریا قرار گرفته است، جمع آوری شد. سپس، اندام‌های مختلف گیاه (گل و پرچم) جداسازی شده و در آون در دمای ۴۵ درجه سلسیوس خشک گردید.

## سنتز نانو ذرات نقره:

مقدار ۵ گرم از پودر گلبرگ زعفران توزین گردیده و به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر اضافه گردید (Sre et al., 2015). مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه روی حمام بن‌ماری عصاره‌گیری شد. برای سنتز نانو ذرات نقره، محلول نیترات نقره (۰/۰۲۵ M) و عصاره با نسبت ۱:۱ مخلوط شده و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تحت امواج مافوق صوت قرار گرفت. با گذشت زمان، رنگ مخلوط واکنش از بنفش به سیاه تغییر رنگ داد. نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از سانتریفوژ از مخلوط جدا شده و به مدت ۱۲ ساعت در آون (با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) خشک گردیدند (Pourmortazavi et al., 2015; Sadeghi et al., 2015).

### اندازه‌گیری ترکیبات موجود در عصاره زعفران:

#### تهیه عصاره:

۲/۵ گرم از پودر گلبرگ زعفران به ۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول، متانول، کلروفرم و اتیل استات اضافه شد. برای استخراج عصاره، مخلوط حاصل از هر یک از حلال‌ها به مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مغناطیسی همزده شد. مخلوط حاصل از هر کدام از حلال‌ها را صاف نموده و حلال آن‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط روتاری تبخیر گردید. عصاره‌های حاصل خشک گردیده و مقدار ۰/۱ گرم از عصاره‌های فوق در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪ حل گردیده و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت (Seralathan et al., 2014).

قرار گرفته و بعد از اتمام زمان فوق جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ nm قرائت گردید. از غلظت‌های مختلف تانیک اسید (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ ppm) به عنوان استاندارد استفاده شد. برای اطمینان از صحت نتایج، آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج متوسط مورد استفاده قرار گرفت (A). برای اندازه‌گیری تانن لازم است ترکیبات فنلی در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شود. بنابراین اندازه‌گیری ترکیبات فنلی طبق روش گفته شده (مرحله قبل) در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید (B). مقدار تانن کل با کاستن نتایج مرحله A از B بدست می‌آید (Nazari et al., 2013).

#### اندازه‌گیری کل ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره:

برای اندازه‌گیری میزان فلاونوئید، ۱ میلی‌لیتر عصاره، ۱ قطره اسید استیک رقیق و ۱ میلی‌لیتر محلول (۲٪)  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  در اتانول ۵۰٪ مخلوط گردیده و به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از گذشت ۴۰ دقیقه جذب محلول‌ها در حضور شاهد در طول موج ۴۱۵ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. برای تهیه محلول شاهد، ۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۱ قطره اسید استیک رقیق مخلوط شده و با اتانول ۵۰٪ به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. از غلظت‌های مختلف روتین (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ ppm) به عنوان استاندارد استفاده شد. عدد بدست آمده در این مرحله برحسب میلی‌گرم روتین برحسب گرم گلبرگ زعفران خشک گزارش گردید (Goulas et al., 2010).

#### اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی از روش (Araujo et al., 2013) و (Trigueros, et al., 2014) با اندکی تغییرات استفاده گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فولین فنل شیکالتو ۰/۵ M و ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۱۰٪ با هم مخلوط شده و به مدت ۱ ساعت در تاریکی (دمای اتاق) قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان فوق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده و مقدار فنل تام موجود در عصاره زعفران بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گلبرگ زعفران خشک گزارش گردید. از غلظت‌های مختلف گالیک اسید (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ ppm) به عنوان استاندارد استفاده شد.

#### بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی:

برای اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی از روش (Shao et al., 2014) و (Karimi et al., 2010) استفاده شد. ۰/۰۵ گرم از پودر گیاه به ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ اضافه شده و به مدت ۴۵ دقیقه توسط امواج مافوق صوت با توان ۳۵۰ وات و قدرت ۵۰ هرتز، عصاره‌گیری گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ حاصل شده تا عصاره از پودر گیاه جدا شود. عصاره‌های متانولی مختلف به ترتیب با غلظت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ از عصاره اولیه تهیه گردید. ۷۵ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های فوق با ۳/۹ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۲۰-دی فنیل پیکرل

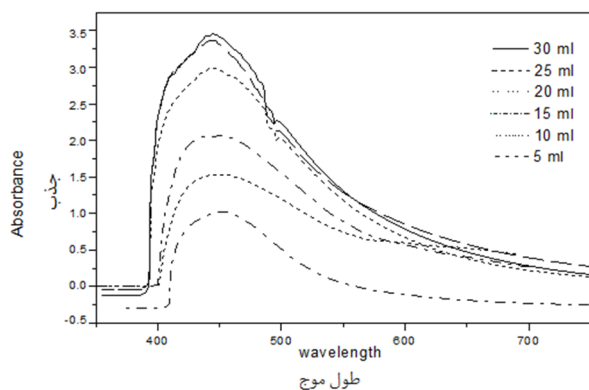
#### اندازه‌گیری مقدار تانن عصاره:

۰/۱ گرم پلی وینیل پلی پیرولیدون<sup>۱</sup> با ۱ میلی‌لیتر عصاره مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه همزده شد. مخلوط حاصل سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) شده و عصاره حاصل استخراج گردید. سپس، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فولین فنل شیکالتو ۰/۵ M و ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۱۰٪ با هم مخلوط و به مدت ۱ ساعت در تاریکی و دمای اتاق

1.- Polyvinylpolypyrrolidone

طیف مربوطه در شکل آورده نشده است). بنابراین دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه انتخاب شد.

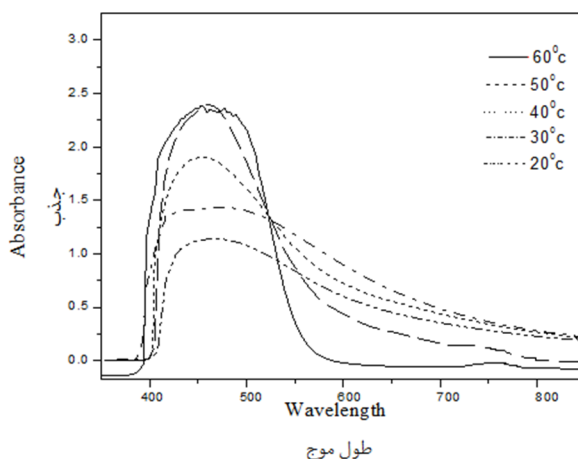
هیدرازیل) مخلوط شده و پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ nm قرائت گردید.



شکل ۱. اثر حجم عصاره بر سنتز نانوذرات نقره

Fig 1. The effect of volume of  $AgNO_3$  solution on the synthesis of silver nanoparticles

همچنین با توجه به ارتباط مستقیم اندازه نانوذرات با طول موج جذبی به نظر می‌رسد در دماهای ۲۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس نانوذرات نقره با ابعاد متفاوت تشکیل می‌شود اما در دمای ۶۰ درجه سلسیوس جذب محلول در گستره‌ی ۴۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر با  $\lambda_{max}$  حدود ۴۳۵ است، که نشان از سنتز نانوذرات با ابعاد نزدیک به هم دارد بنابراین دمای ۶۰ به عنوان دمای بهینه انتخاب شد (Huang et al., 2007).



شکل ۲. تأثیر دمای واکنش بر سنتز نانوذرات نقره

Fig 2. The effect of reaction temperature on the synthesis of silver nanoparticles

### سنتز نانوذرات نقره:

برای سنتز ذرات نانو نقره از عصاره آبی گلبرگ زعفران استفاده شد. برای دستیابی به شرایط بهینه و تولید نانوذرات با راندمان بالا شرایط مختلف از جمله غلظت عصاره، دما و زمان مورد بررسی قرار گرفت. سپس، نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از تکنیک‌های طیف سنجی طیف‌های ماورای بنفش/مرئی (UV-Vis)، زیر قرمز (IR)، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی (TEM) و اشعه ایکس (XRD) شناسایی شدند.

### نتایج و بحث

#### بهینه سازی شرایط واکنش

#### بررسی تأثیر غلظت نیترات نقره بر سنتز نانوذرات نقره:

برای بررسی اثر غلظت نیترات نقره، سنتز نانوذرات نقره با حجم‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌لیتر) از محلول نیترات نقره (غلظت یکسان) انجام شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود افزایش غلظت در راندمان سنتز نانوذرات تأثیر مثبت دارد به طوری که با افزایش حجم عصاره از ۵ به ۲۵ میلی‌لیتر، میزان نانوذرات سنتز شده افزایش چشمگیری می‌یابد که در شکل قابل مشاهده است، اما افزایش غلظت تأثیر چندانی در اندازه نانوذرات ندارد، از آنجایی که در شکل ۱  $\lambda_{max}$  نمودارهای مختلف حدود ۴۳۵ و یکسان بوده از طرفی  $\lambda_{max}$  ارتباط مستقیم با اندازه نانوذرات دارد. بنابراین، افزایش غلظت عصاره تأثیر چندانی در اندازه‌ی نانوذرات ندارد.

#### بررسی تأثیر دما بر سنتز نانوذرات نقره:

دما تأثیر زیادی در راندمان سنتز نانوذرات دارد. سنتز نانوذرات نقره در دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سلسیوس) انجام شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش دما از ۲۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس افزایش چشمگیری در میزان جذب ماکزیمم مشاهده می‌شود. انجام واکنش در دمای بالاتر از ۶۰ درجه سلسیوس تغییر محسوسی در افزایش جذب ندارد

### شناسایی نانوذرات نقره

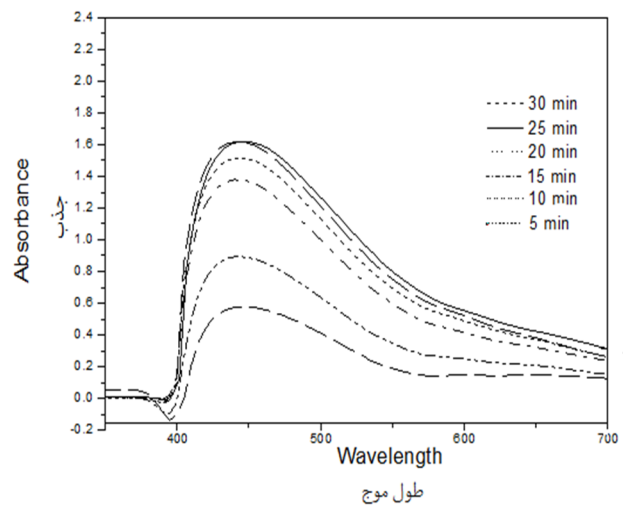
بررسی طیف XRD نانوذرات نقره سنتز شده: طبیعت کریستالی و ساختاری نانوذرات نقره با استفاده از XRD مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، طیف XRD نانوذرات نقره ساختار کریستالی در  $2\theta$  برابر با:  $38.1^\circ$ ،  $44.2^\circ$ ،  $64.3^\circ$ ،  $77.3^\circ$ ،  $81.4^\circ$  درجه نشان می‌دهد که با توجه به اندیس‌های میلی‌ری که در شکل ۴ مشخص است به ترتیب مربوط به  $(111)$ ،  $(200)$ ،  $(220)$ ،  $(311)$  و  $(222)$  بوده و شکل هندسی نانو ذرات سنتزی به صورت مکعب مراکز وجوه پر می‌باشد. برای تعیین میانگین اندازه ذرات از معادله شرر استفاده شد (معادله ۱). با استفاده از این معادله میانگین اندازه ذرات  $18 \text{ nm}$  تعیین گردید. همچنین در طیف حاضر هیچگونه پیکی مربوط به اکسید نقره دیده نشد.

$$d = 0.9\lambda / \beta \cos\theta \quad (\text{معادله ۱})$$

$d$ : میانگین قطر ذرات  
 $\lambda$ : طول موج پراش اشعه ایکس  
 $\beta$ : عرض پیک در نصف ارتفاع

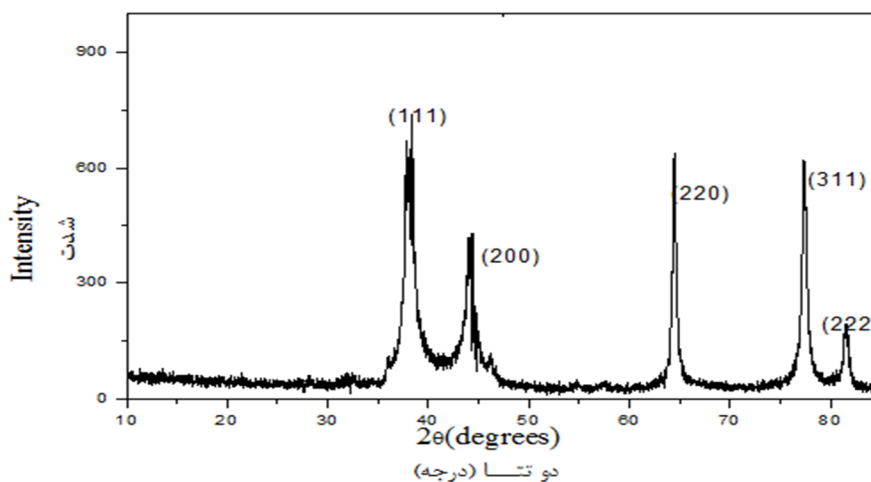
### بررسی تأثیر زمان بر سنتز نانوذرات نقره:

برای دستیابی به بهترین راندمان در سنتز نانوذرات نقره، تأثیر زمان در واکنش فوق مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود زمان تأثیر زیادی در راندمان سنتز نانوذرات نقره دارد. سنتز نانوذرات نقره در بازه زمانی ۵ الی ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد زمان بهینه برای سنتز نانوذرات ۲۵ دقیقه است. همچنین، به نظر می‌رسد زمان بر اندازه نانوذرات نقره تأثیر قابل توجهی ندارد.



شکل ۳. تأثیر زمان بر سنتز نانوذرات نقره

Fig 3. The effect of contact time on the synthesis of silver nanoparticles



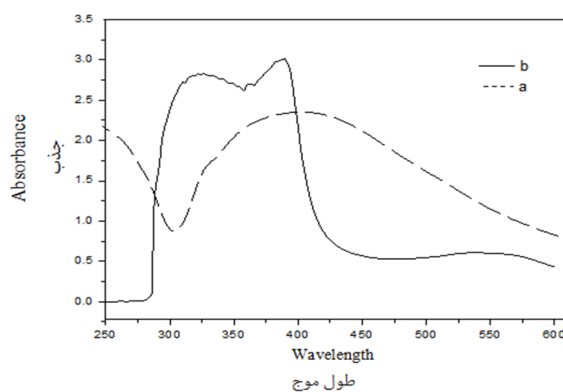
شکل ۴. طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره سنتز شده

Fig 4. X-ray diffraction patterns of Silver nanoparticles

### بررسی طیف ماورای بنفش-مرئی نانوذررات نقره

سنتز شده:

طیف UV-Vis عصاره جذب قوی در ناحیه ماورای بنفش (۲۸۰ تا ۳۲۰ نانومتر) دارد که مربوط به حلقه‌های آروماتیک با سیستم‌های کانجوگه است. همچنین، جذب مشاهده شده در ناحیه مرئی مربوط به رنگ عصاره است (شکل ۵b). با اضافه کردن نیترات نقره به عصاره، بتدریج رنگ مخلوط از بنفش به سیاه تغییر می‌کند که این تغییر رنگ نشانه تشکیل نانوذررات نقره می‌باشد. در طیف UV-Vis نانوذررات نقره، جذب قوی در حدود ۴۳۵ نانومتر مشاهده می‌شود که سنتز نانوذررات نقره را اثبات می‌کند (شکل ۵a).



شکل ۵. طیف UV-Vis (a) نانو ذرات نقره، b. عصاره

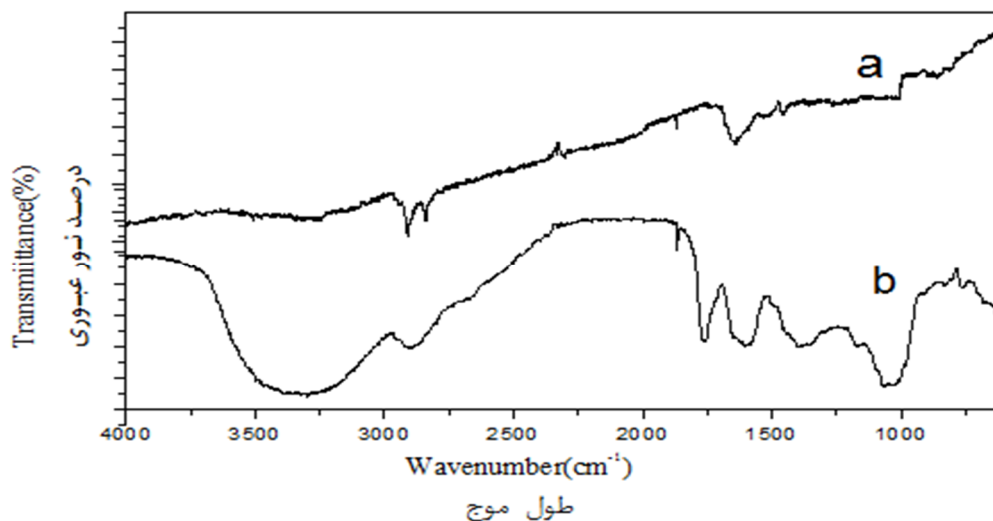
Fig 5. UV-Vis spectra of silver nanoparticles (a) saffron extract (b)

### بررسی طیف IR نانوذررات نقره سنتز شده:

شکل ۶ طیف IR عصاره گلبرگ زعفران و نانو ذرات نقره را نشان می‌دهد. همانگونه که در طیف IR عصاره (شکل ۶b) مشاهده می‌شود پیک‌های موجود در طول موج nm ۲۸۰۰ و ۲۹۰۰ (C-H الکانی)، ۳۳۰۰ (OH)، ۱۶۰۰nm (ارتعاش کششی C=C)، ۱۷۱۵ (C=O) و حلقه بنزنی در طول موج ۱۵۵۰ نانومتر وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها را اثبات می‌کند (Kumar et al., 2011). در طیف IR نانوذررات نقره (شکل ۶a) نیز پیک‌های موجود در طول موج ۳۳۰۰ (OH)، ۲۹۰۰ و ۲۸۰۰ (CH الکانی) و حلقه بنزنی (۱۵۵۰) مشاهده می‌شود که وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها را بر روی نانوذررات نقره اثبات می‌کند.

### بررسی طیف TEM نانوذررات نقره سنتز شده:

شکل ۷ تصویر TEM نانوذررات نقره را نشان می‌دهد. همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود نانوذررات نقره کریستالی بوده و شکل کروی دارند. همچنین، اندازه نانوذررات نقره حدود ۱۸ نانومتر است که با اندازه ذرات محاسبه شده در طیف XRD مطابقت دارد.

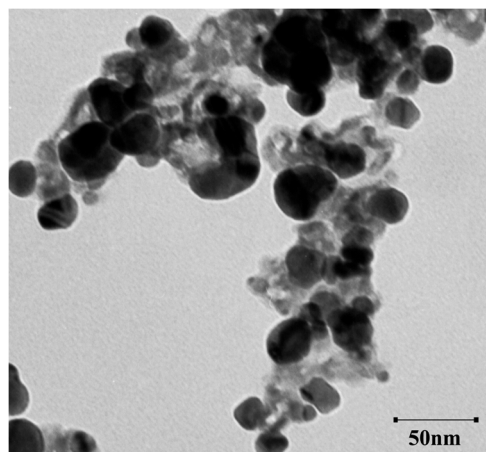


شکل ۶. مقایسه طیف IR نانوذررات نقره سنتزی (a-طیف نانوذررات نقره، b-طیف عصاره آبی زعفران)

Fig 6. The comparison of IR spectra of (a) silver nanoparticles (b) aqueous extract of Petals of saffron)

می‌شود. محتوای فلاونوئید تام ترکیبات گیاهی با استفاده از استاندارد روتین به روش رنگ سنجی ارزیابی می‌شود. اندازه گیری مقدار تانن با مقایسه جذب نمونه‌ها و جذب استاندارد تانیک اسید انجام می‌شود.

به منظور اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و تانن، عصاره‌گیری از گلبرگ زعفران با حلال‌های مختلف (اتانول، متانول، کلروفرم، آب/اتانول با نسبت مساوی و اتیل استات) انجام شد. میزان ترکیبات فنلی (بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم گیاه خشک)، تانن (بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گیاه خشک) و فلاونوئیدها (بر حسب میلی‌گرم روتین بر گرم گیاه خشک) در عصاره‌های حاصل از حلال‌های مذکور اندازه‌گیری شد (جدول ۱). نتایج نشان داد عصاره‌ی متانولی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی ( $87.6 \times 10^{-3}$  mg/g) و عصاره کلروفرمی کمترین مقدار ترکیبات فنلی ( $14.08 \times 10^{-3}$  mg/g) را دارا می‌باشد. بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده در عصاره‌ی اتانولی ( $32.68 \times 10^{-3}$  mg/g) و کمترین مقدار فلاونوئیدها مربوط به عصاره کلروفرمی ( $2.07 \times 10^{-3}$  mg/g) می‌باشد. همچنین، عصاره‌ی اتانولی حاوی بیشترین مقدار تانن استخراج شده ( $19.79 \times 10^{-3}$  mg/g) است.



شکل ۷. تصویر TEM نانوذرات نقره

Fig 7. TEM images of silver nanoparticles

### اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و تانن عصاره گلبرگ زعفران:

عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها با کاهش استرس اکسیداتیو باعث آثار محافظتی سلول‌ها می‌شوند. پلی فنل‌ها بطور گسترده در بسیاری از مواد غذایی با منشأ گیاهی یافت می‌شوند و تأثیرات آنتی‌اکسیدانی زیادی دارند. محتوای تام فنولی با روش فولین سیو-کالتو بصورت میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره براساس معادله‌ی خط منحنی استاندارد محاسبه

جدول ۱. میزان ترکیبات فنلی (بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گیاه خشک)، تانن (بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم گیاه خشک) و فلاونوئیدها (بر حسب میلی‌گرم روتین بر گرم گیاه خشک) در عصاره‌های مختلف گلبرگ زعفران

Table 1. The amount of phenolic compounds (galic acid mg/gr of dry plant), tannin (tannic acid mg/gr of dry plant) and flavonoids (rutin mg/gr of dry plant) in different solvent extracts of Petals of saffron.

عصاره extracts	فلاونوئید flavonoids	ترکیبات فنلی Phenolic compounds	تانن tannin
آب- اتانول Water-ethanol	$28.01 \times 10^{-3}$	$45.36 \times 10^{-3}$	$14.81 \times 10^{-3}$
اتانول ethanol	$32.68 \times 10^{-3}$	$36.28 \times 10^{-3}$	$19.79 \times 10^{-3}$
متانول Methanol	$31.08 \times 10^{-3}$	$87.6 \times 10^{-3}$	$16.98 \times 10^{-3}$
کلروفرم Chloroform	$2.07 \times 10^{-3}$	$14.08 \times 10^{-3}$	$2.31 \times 10^{-3}$
اتیل استات Ethyl acetate	$3.87 \times 10^{-3}$	$19.88 \times 10^{-3}$	$3.88 \times 10^{-3}$

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی:

برای بررسی فعالیت ضد رادیکالی از رادیکال پایدار DPPH (۲-۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل) استفاده گردیده و نتایج آزمایش بر اساس مقدار  $IC_{50}$  (غلظتی از ترکیب آنتی‌اکسیدان بوده که در واکنش ۵۰٪ DPPH (۲-۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل) را احیا می‌کند) در جدول ۲ بیان شده است. برای محاسبه  $IC_{50}$  از معادله ۲ استفاده شد. هر چه شاخص  $IC_{50}$  کمتر باشد، عصاره گیاهی فعالیت ضد رادیکالی بیشتری دارد.  $IC_{50}$  عصاره متانولی گلبرگ زعفران ۵/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که در مقایسه با  $IC_{50}$  کلالة زعفران (۲۱۰.۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کاهش دارد (Karimi et al., 2010) و کاهش مقدار  $IC_{50}$  گلبرگ زعفران احتمالاً به دلیل کاهش مقدار ترکیبات فنلی گلبرگ در مقایسه با کلالة زعفران می‌باشد.

معادله (۲)

$$\% RSC = 1 - (A / \text{کنترل} / A / \text{نمونه}) \times 100$$

RSC٪: درصد باز داری

نمونه A: مقدار جذب نمونه

کنترل A: مقدار جذب DPPH

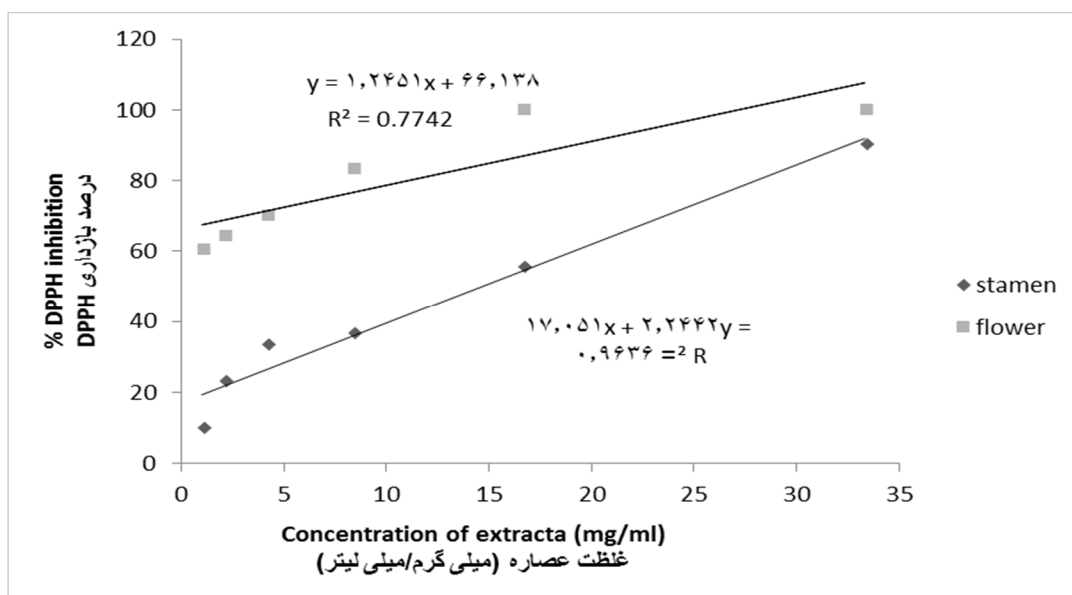
جدول ۲. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ( $IC_{50}$ (mg/ml) عصاره

گلبرگ زعفران

Table 2. Antioxidant activity ( $IC_{50}$  (mg/ ml) of Petals of saffron

اندام گیاه Plant organ	توان مهار رادیکال آزاد ( $IC_{50}$ (mg/ml)
گلبرگ Petal	5.9
پرچم Stamen	14.71

همچنین در شکل ۸ رابطه خطی بین درصد بازداری مقدار DPPH (۲-۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل) در برابر مقدار غلظت عصاره گیاه نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره، درصد بازداری DPPH (۲-۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل) افزایش می‌یابد.



شکل ۸. رابطه خطی بین درصد بازداری مقدار DPPH در برابر مقدار غلظت عصاره بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر  
Fig 8. DPPH radical scavenging activities of Petals extract of saffron



## نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نانوذرات نقره (با اندازه ۱۸ nm) با استفاده از عصاره آبی گلبرگ زعفران سنتز شدند. نانوذرات سنتز شده توسط تکنیک‌های UV-Vis, IR و XRD شناسایی و مورد تأیید قرار گرفتند. همچنین به منظور اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و تانن، عصاره گیری از گلبرگ زعفران با حلال‌های مختلف (اتانول، متانول، کلروفرم، آب/اتانول با نسبت مساوی و اتیل استات) انجام شد. نتایج نشان داد بیشترین کمترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در عصاره متانولی ( $87.6 \times 10^{-3}$  mg/g) و عصاره کلروفرمی ( $14.08 \times 10^{-3}$  mg/g) می‌باشد. همچنین، بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده در عصاره اتانولی ( $32.68 \times 10^{-3}$  mg/g) و کمترین مقدار

فلاونوئیدها مربوط به عصاره کلروفرمی ( $2.07 \times 10^{-3}$  mg/g) می‌باشد. همچنین، بیشترین مقدار تانن استخراج شده در عصاره اتانولی ( $19.79 \times 10^{-3}$  mg/g) مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گلبرگ زعفران نسبت به کلاله کمتر است، اما در مقایسه با بسیاری از گیاهان از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار است. بنابراین، گلبرگ زعفران می‌تواند به عنوان منبع غنی آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه بیرجند و گروه پژوهشی زعفران به خاطر حمایت مالی این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

## منابع

- AbdelHamid, A. A., Al-Ghobashy, A. M., Fawzy, M., Mona B. Mohamed, M. B., Abdel-Mottaleb, M., 2013. Phytosynthesis of Au, Ag, and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract of sago pondweed (*Potamogeton pectinatus* L.). *Sustainable Chem. Eng.* 1, 1520-1529.
- Ahmad, N., Sharma, S., Alam, M.K., Singh, V.N., Shamsi, S.F., Mehta, B.R., Fatma, A., 2010. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids surf. B*: 81, 81-86.
- Araujo, C.R.R., Silva, T. M., Villela, M. L. P., Alcantara, A. F. C., Dessimoni-Pinto, N. A. V., 2013. Total antioxidant capacity, total phenolic content and mineral elements in the fruit peel of *Myrciaria cauliflora*. *Braz. J. Food Technol.* 16, 301-309.
- Baghai, N., and Maleki Farahani, S., 2014. Comparison of nano and micro chiron fertilizers on quantitative yield and assimilates allocation of saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Saff. Res.* 1(2), 156-169. [in persian with English sammary]
- Bar, H., Bhui, D.K., Sahoo, G.P., Sarkar, P., Pyne, S., Misra, A., 2009. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. *Colloids and surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 348, 212-216.
- Dwivedi, A.D., and Gopal, K., 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 369, 27-33.
- Fazli, R., Nazarnezhad, N., Ebrahimzadeh, M., 2013. Evaluation of the antioxidant capacities and total phenolic contents of beech, horn beam and poplar bark. *J. Forest and Wood Prod.* 66(3), 339-349. [in persian with English sammary]
- Goulas, V., Papoti, V., Exarchou, V., Tsimidou, M., Gerathanassis, I, P., 2010. Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3303-3308.
- Hadizadeh, F., Mohajeri, S.A., Seifi, M., 2010. Extraction and purification of crocin from Saffron simple and efficient crystallization method. *Pak. J. Biol. Sci.* 13(14), 691-698.
- Huang, J., Sun, Q. Li. D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., Hong, J., Chen, C., 2007. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnanonum camphora* leaf. *Nanotechnol.* 18, 105-104.
- Jha, A.K., Prasad, K., Prasad, K., Kulkarni, A.R., 2009. Plant system: Nature's nanofactory. *Colloids surf., B.* 73, 219-223.
- 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. *Molec.* 15, 6244-6256.
- Kumar, K, P., Paul, W., Sharma, Ch, P., 2011. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: characterization and blood compatibility. *Process Biochem.* 46, 2007-2013

- Liang, W., Church, T.L., Harris, A.T., 2014. Biogenic synthesis of photocatalytically active Ag/TiO<sub>2</sub> and Au/TiO<sub>2</sub> composites. *Green Chem.* 14, 968-975.
- Nazari, M., Zolfaghari, R., Fayyaz, P., 2013. An i on trends of annual and seasonal rainfall and temperature in different climatologically regions of Iran. *J Forest Wood Products.* 66(1), 1-14.
- Naviglio, D., Conti, S., Ferrara, L., Santini, A., 2010. Determination of moisture in powder and lyophilised Saffron (*Crocus sativus L.*) by karl fischer method. *J. Food Sci.* 4, 1-6.
- Pourmortazavi, S.M., Taghdiri, M., Makari, V., Rahimi-Nasrabadi, M., 2015. Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. *Spectrochim. Acta. Part A.* 136, 1249-1254.
- Prasain, J.K., Wang, C.C., Barnes, S., 2004. Serial Review: Flavonoids and isoflavones (Photoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. *Biol. Med.* 37(9), 1324-1350.
- Sadeghi, B., Rostami, A., Momeni, S.S., 2015. Facile green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of *Pistacia atlantica* and its antibacterial activity. *Spectrochim. Acta Part A.* 134, 326-332.
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S.W., Cho, C.W., Kim, S., Yun, Y.S., 2009. *Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids surf. B* 73, 332-338.
- Seralathan, J., Stevenson, P., Subramaniam, S., Raghavan, R., Pemaiah, B., Sivasubramanian, A., Veerappan, A., 2014. Spectroscopy investigation on chemo-catalytic, free radical scavenging and bactericidal properties of biogenic silver nanoparticles synthesized using *Salicornia brachiata* aqueous extract. *Spectrochim. Acta Part A* 118, 349-355.
- Shao, Y., Tang, F., Huang, Y., Xu, F., Chen, Y., Tong, C., Chen, H., Bao, J., 2014. Analysis of genotype environment interactions for polyphenols and antioxidant capacity of rice by association mapping. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5361-5368.
- Sre, P.R.R., Reka, M., Poovazhagi, R., Arul Kumar, M.A., Murugesan, K., 2015. Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam. *Spectrochim. Acta Part A:* 135, 1137-1144.
- Trigueros, L., Wojdyło, A., Sendra, E., 2014. Antioxidant activity and protein-polyphenol interactions in a Pomegranate (*Punica granatum L.*) Yogurt. *J. Agric. Food Chem.* 62, 6417-6425.
- Valli, J.S., and Vaseeharan, B., 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Cissus quadrangularis* extracts. *Mater. Lett.* 82, 171-173
- Vinod, V.T.P., Saravanan, P., Sreedhar, B., Keerthi Devi, D., Sashidhar, R.B., 2011. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). *Colloids Surf. B.* 83, 291-298.



## Phytochemical Screening of Aqueous Extract of Petals of *Crocus sativus L.* and Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract

Mohammad Ali Nasseri<sup>\*1</sup>, Neda Soleimani<sup>2</sup> and Ali Allahresani<sup>3</sup>

1- Professor of Chemistry, Department of chemistry, Faculty of Sciences, University of Birjand

2- Ms. student of Phytochemistry, Department of chemistry, Faculty of Sciences, University of Birjand

3- Assistant Professor of Chemistry, Department of chemistry, Faculty of Sciences, University of Birjand

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

Received 24 November 2014; Accepted 25 August 2015

### Abstract

During the last decade, the synthesis of metal nanoparticles with approximately 1-100 nm have received considerable attention. These nanoparticles have various usages in diffrents fields of sciences and technology. In this study, silver nano-particles were synthesized by the petals and stamens extract of *Crocus sativus L.* The silver nano-particles were characterized by X-ray Diffraction (XRD), In-fra-red Spectroscopy (IR), Ultraviolet/Visible Spectroscopy (Uv/Vis) and Transmission electron microscopy (TEM). All techniques were confirmed the synthesis of silver nano-particles. The size of silver nano-particles was calculated by X-ray diffraction (18 nm). The size of nano-particles in TEM images of silver nano-particles was accordance with X-ray diffraction (18 nm). Furthermore, the amount of phenolic compounds and flavonoids of Petals and stamens of *Crocus sativus L.* were investigated in four solvents with different polarities (Ethanol, Methanol, Chloroform and Ethyl acetate). The results showed that, the ethanol and methanol extracts of Petals are enrich in phenolic and flavonoid compounds, ( $32.68 \times 10^{-3}$  mg/g and  $87.6 \times 10^{-3}$  mg/g, respectively). Also, the least amount of phenolic and flavonoid compounds of all tissues (Petals and stamens) was extracted in the chloroform extracts. In additions, the antioxidant capacity ( $IC_{50}$ ) of Petals and stamens were investigated. Methanol extract of all tissues were extracted and the antioxidant capacity were determined as quenching the 2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl (DPPH). The results showed that petals have higher antioxidant capacity than stamens of *Crocus sativus L.* ( $IC_{50}=5.79$  and 14.71 mg/ml, respectively).

**Keywords:** Flavonoids, Petals of Saffron, Phenolic Compounds, Silver Nanoparticles. .