Archive

نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد هفتم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۸
شماره صفحه: ۱۲۲-۱۰۹
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2018.1006.1042

مقاله پژوهشی:

تأثیر رژیم‌های آبیاری بر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله زعفران

رضا دهقانی بیدگلی[1*]، امیر سالاری[2] و مهدی بشیری[3]
۱- استادیار گروه مرتع و آبخیزداری دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین دانشگاه کاشان
۲- استادیار گروه تولیدات گیاهی و گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زعفران دانشگاه تربت حیدریه
۳- استادیار گروه مهندسی طبیعت و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تربت حیدریه
*نویسنده مسئول: *Email: dehghanir@kashanu.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۶

چکیده

عوامل محیطی مانند تغذیه گیاه و رطوبت در دسترس بر خصوصیات کمی و کیفی گیاهان از جمله محتوی ترکیبات فنلی شامل فلاونوئید، تانن و آنتوسیانین‌ها تأثیرگذار می‌باشند. یکی از گیاهان دارویی بومی ایران، زعفران است که سابقه استفاده از ترکیبات آن به زمان‌های کهن برمی‌گردد. تحقیق حاضر به منظور بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله گیاه زعفران تحت تأثیر تیمارهای آبیاری شامل ظرفیت زراعی (*FC*)، متوسط (*FC* ۱:۲)، کم (*FC* ۲:۳) و خیلی کم (*FC* ۱:۳) انجام گردید. در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا پیازها در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت و بررسی خصوصیات فیتوشیمی عصاره گیاه انجام شد. سپس سنجش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام به روش اسپکتروفتومتری صورت گرفت و در نهایت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله در غلظت‌های مختلف با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (*DPPH*) اندازه‌گیری شد. نتایج آزمون فیتوشیمیایی وجود ترکیبات ثانویه‌ای مانند تانن، آنتوسیانین و فلاونوئید و عدم وجود آلکالوئید را تأیید کرد. همچنین میزان ترکیبات فلاونوئیدی موجود در نمونه آبیاری شده ۱:۲ ظرفیت زراعی بیش‌تراز سایر نمونه‌ها بود. نمونه آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی و نمونه آبیاری شده در حد ۱/۳ ظرفیت زراعی به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ترکیبات فنلی و نمونه آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آزمون فیتوشیمیایی، ظرفیت زراعی، عصاره، فلاونوئید

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی تنها به کشورهای در حال توسعه اختصاص ندارد، این گیاهان، در کشورهای پیشرفته نیز از عوامل مهم و مؤثر در ساخت دارو، درمان، بهداشت و سلامت جامعه می‌باشند (*Shahrokhi, 1996*). به عبارت دیگر، استفاده از گیاهان دارویی به منظور استخراج عصاره و برای تولید دارو و نیز جایگزینی آنها با داروهای شیمیایی برای حفظ سلامتی انسان‌ها از مهم‌ترین نیازهای تمدن امروزی می‌باشد (*Ramesh & Okigbo, 2008*). به علت وجود شرایط اقلیمی مناسب و سایر فاکتورهای جغرافیایی خاص، گیاهان متنوع و زیادی در بسیاری از نقاط ایران می‌رویند که بیشتر آن‌ها خصوصیات درمانی مهمی دارند (*Abdali, 2008*)، لذا کشور ایران با سابقه درخشان در طب سنتی و استعداد بالقوه در تولید گونه‌های گیاهی، یکی از مناسب‌ترین مناطق برای تهیه، تولید و صادرات گیاهان دارویی است که می‌توان از طریق آن علاوه بر بهره‌مندی از سایر منافع ملی، در چارچوب سیاست‌های کشور مبنی بر افزایش صادرات غیرنفتی، به بازارهای جهانی نیز دست یافت (*Amanpoor, 2000*). بر این اساس، در برخی پژوهش‌ها به توانمندی‌های اکولوژیک و اقلیمی کشور ایران در تولید بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاه دارویی و استخراج مواد مؤثره از آن‌ها پرداخته شده است (*Omidbeygi, 2000*).

ترکیبات فنلی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها می‌باشند که معمولاً در میوه، سبزی، برگ، آجیل، دانه، ریشه و سایر اندام‌های گیاهی دیده می‌شوند، این مواد منافع قابل توجهی در زمینه صنایع غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی از جمله خصوصیات آنتی‌اکسیدانی دارند (*Raghavendra et al., 2010; Batooli, 2000; Zarezadeh, 2000*). در سال‌های اخیر ثابت شده است که رادیکال‌های آزاد مهم‌ترین عوامل اکسیدکننده مواد غذایی هستند که با یک روند تخریبی باعث از بین رفتن ارزش غذایی و تغییر در ترکیبات شیمیایی آن‌ها می‌گردند (*Henry & Heppell, 2002; Robards et al., 1988*).

فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیکی متنوع این ترکیبات از جمله آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، ضدالتهاب آن‌ها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است. ترکیبات فنلی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند. درک بهتر از شرایط استقرار گیاهان دارویی این امکان را فراهم می‌سازد تا رویشگاه این گیاهان با کارایی بیشتری اداره شود، زیرا شرایط رویشگاه تأثیر در میزان و کیفیت عناصر این گیاهان دارد (*Miraskarshahi, 2002; Rahimi et al., 2009*). همچنین استقرار این قبیل گیاهان در مکان رشد، منجر به افزایش زیست‌توده گیاهی شده و شاخصی از سازگاری و کارآمدی گیاه در رویشگاه خود به شمار می‌رود. متغیرهای کمی از ویژگی‌های مهم این قبیل گیاهان محسوب می‌شود. این ویژگی‌ها، شاخصی از سازگاری و کارآمدی گیاه در رویشگاه بوده و تابع برخی از عوامل محدودکننده محیطی می‌باشد که در مناطق خشک، آب یکی از مهمترین آن‌ها به شمار می‌رود. از سوی دیگر، کمبود آب در مناطق خشک و نیمه‌خشک که بخش عمده‌ای از کشور ما نیز در آن قرار دارد، یکی از تنگناهای توسعه اقتصادی در بخش کشاورزی و منابع طبیعی محسوب می‌شود (*Froozeh, 2006*).

آبیاری سیلابی یکی از روش‌های اصلاح مراتع خشک و نیمه خشک محسوب شده که به عنوان عاملی در جهت ایجاد تغییرات کمی و کیفی پوشش گیاهی در این گونه مناطق شناخته شده است (*Kowsar, 1993; Moghadam, 1998; Mesbah, 2001; Mesdaghi, 2003*).

زعفران با نام علمی *Crocus sativas var. officinalis* از خانواده زنبقیان[1] گیاهی علفی، پایا و بدون ساقه است که دارای غده‌های پیاز مانند توپر به‌نام «بنه» با قطر ۳-۵ سانتی‌متر می‌باشد. هر پیاز ۶-۹ برگ باریک نظیر برگ علف‌های چمنی تولید می‌کند و نیز دارای ۱-۳ گل ارغوانی و هر گل دارای شش گل‌برگ می‌باشد. مادگی در مرکز گل قرار گرفته و دارای یک تخمدان غده‌ای بوده و از قسمت تخمدان، خامه باریکی خارج می‌گردد. خامه زرد رنگ به یک کلاله شفاف قرمز نارنجی سه شاخه‌ای به طول ۲/۳-۵ تا ۳ سانتی‌متر تقسیم می‌شود. سه کلاله همراه با خامه‌ای که حدود پنج سانتی‌متر است، پس از خشک کردن،

1- *Iridaceae*

www.SID.ir

Archive of SID

همان زعفران تجارتی را تشکیل می‌دهد. گیاه زعفران کاملاً عقیم است و تکثیر زعفران تنها از طریق ایجاد پیازهای کوچک[2] جدید که از پیاز مادری[3] تولید می‌شود، به‌وجود می‌آید. پیاز زعفران در ماه‌های تابستان به‌صورت راکد در زمین باقی می‌ماند و دوران استراحت خود را با تکمیل فیزیولوژیکی جهت گل‌دهی مجدد طی می‌کند، این گیاه رشد دوباره خود را در حدود پایان فصل تابستان شروع کرده و در اواسط پائیز گل می‌دهد. انتشار جغرافیایی زعفران در ایران شامل استان‌های خراسان (قائنات، بیرجند و گناباد)، یزد، کرمان، گیلان و مازندران می‌باشد. در سال‌های اخیر زعفران در کرج و قم نیز کشت شده است. ترکیبات زرد رنگ و محلول در آب که از مشتقات کروستین به شمار می‌روند.

زعفران گیاهی چندساله و ژئوفیت-تریپلوئید[4]است که می‌تواند بسته به شرایط آب‌وهوای منطقه کشت شده و ۱۴-۸ سال به روند تولیدی خود ادامه دهد (*Koocheki & Seyyedi, 2015*). دوره شکوفایی گل‌ها از اواخر مهر تا اواخر آبان می‌باشد. روند رشد رویشی گیاه تا اواخر اردیبهشت‌ماه ادامه دارد. از اواخر اردیبهشت تا اواسط مهرماه گیاه زعفران به خواب‌رفته و برگ‌ها خشک می‌شود (*Amirshekari et al., 2007*).

زعفران و دارای انواع زیادی از ترکیبات فلاوونوئیدی و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. این ترکیبات دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی هستند. ترکیب تلخ آن پیکروکروسین و ترکیب معطر آن سافرانال می‌باشد. همچنین حدود ده درصد روغن ثابت دارد که شامل اسید اولئانولیک می‌باشد. ریبوفلاوین از دیگر ترکیبات موجود در زعفران عصاره زعفران است که به نام *"Swedish bitters"* گفته می‌شود، توسط کارخانجات زیادی تهیه و به بازار عرضه می‌شود. در تحقیقاتی که به تازگی در آمریکا صورت گرفت، نشان داده شده است که کروستین موجود در زعفران در نخاع، فشار خون، ادم مغزی و پاپیلمای پوست در حیوانات اثرات مثبت و ارزنده‌ای ایجاد کرده است. تحقیقات دیگری نشان داده است که زعفران اکسیژن پلاسما را افزایش داده و دارای اثرات ضدسرطان می‌باشد (*Ramesh & Okigbo, 2008*).

تحقیقات دیگری نشان داده که زعفران می‌تواند باعث کاهش تری‌گلیسریدها و کلسترول گردد. همچنین مطالعاتی در اسپانیا نشان داد که کاهش امراض قلبی در قسمتی از این منطقه احتمالاً مربوط به مصرف دائم از زعفران می‌باشد (*Jamshidi et al., 2010*).

از آنجا که گونه‌های مختلف گیاهان در قبال عملیات آبیاری، عکس‌العمل‌های متفاوتی از خود بروز می‌دهند، لذا در این تحقیق با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد گونه دارویی زعفران تأثیر روش‌های آبیاری بر متغیرهای کمی گونه مذکور مورد بررسی قرار گرفت. همچنین این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از عصاره‌های این گیاه به عنوان منبع ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان جهت استفاده در صنایع غذایی و دارویی باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف بررسی تأثیر چند روش آبیاری و رطوبت در دسترس گیاه بر ترکیبات فنلی و خصوصیات آنتی-اکسیدانی عصاره گل زعفران در چهار کرت به مساحت ۱۰۰ متر مربع واقع در در شهرستان نطنز واقع در استان اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۳انجام گرفت.

روش نمونه‌برداری

پیازها در تیرماه سال ۱۳۹۳ به کرت‌های مورد نظر انتقال یافتند. پیازها به صورت ردیف‌های منظم قرار داشتند و به مدت دو سال تحت تأثیر تیمارهای ظرفیت زراعی (*FC*)، متوسط (۱:۲*FC*) و کم (۲:۳*FC*) و خیلی کم (۱:۳*FC*). نمونه‌برداری از گل‌ها در آذرماه سال ۱۳۹۵ همزمان با فصل گلدهی از گل‌های ۲۵۰ پایه به صورت تصادفی انجام گردید.

عملیات آزمایشگاهی

تهیه عصاره الکلی زعفران

گل‌های برداشت شده به آزمایشگاه منتقل و عصاره‌گیری از آن‌ها شروع شد، روش عصاره‌گیری از نوع ماسراسیون بود. در این روش کلاله بعد از برداشت از سایر اجزای گل جدا شده و پودر گردید. سپس با استفاده از حلال اتانولی اقدام به عصاره‌گیری به روش سوکسله شد. در این روش عصاره‌گیری، ۱۰ گرم پودر کلاله زعفران در ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ به مدت سه روز خیسانده شد. پس از صاف

1- Cormel
2- Corm
3- Triploid geophyte

www.SID.ir

Archive of SID

کردن محلول به دست آمده با صافی، حلال توسط دستگاه روتاری اواپوراتور[5] (شرکت مهین‌آزما، ایران، مدل ۲۱۸۰) تحت خلاء و در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد حذف شد. عصاره تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (*Mousavi et al., 2009*).

تشخیص آلکالوئید

به منظور شناسایی آلکالوئیدهای موجود در عصاره از آزمون واگنر- مایر استفاده شد. در این روش ابتدا ۰/۵ گرم عصاره خشک در بشر ریخته و ۱۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک دو نرمال به آن اضافه شد، مخلوط به مدت پنج دقیقه درون بن ماری با دمای ۴۵ درجه قرار داده و با یک همزن مخلوط هم زده شد. سپس محلول از کاغذ صافی عبور داده شد و محلول به دو لوله آزمایش منتقل شد. به لوله آزمایش اول چند قطره معرف مایر اضافه شد. تشکیل رسوب سفید به این معناست که عصاره دارای آلکالوئید است. به لوله آزمایش دوم چند قطره معرف واگنر اضافه شد، رسوب قرمز نشان‌دهنده وجود آلکالوئید است (*Brain & Turner, 1975, Chhabra et al., 1984*).

تشخیص تانن

به منظور شناسایی تانن موجود در عصاره از دو آزمون استفاده شد.

آزمون رنگی با محلول کلرید آهن: به این صورت‌که ۱۰میلی‌لیتر اتانول بر روی ۰/۲ گرم پودر گیاه ریخته و خوب تکان داده شد. سپس محلول مورد نظر از صافی عبور داده شد و به محلول صاف شده پنج قطره محلول کلرید - آهن اضافه شد، تغییر رنگ محلول به آبی یا سبز نشان-دهنده وجود تانن است.

آزمون ژلاتین: ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر به جوش آورده شد و ۰/۵گرم عصاره در آن حل شد. محلول در محیط قرار گرفته شد تا به دمای آزمایشگاه برسد، سپس پنج قطره محلول سدیم کلرید ۱۰ درصد به محلول اضافه شد تا ترکیبات غیر تاننی رسوب کند، در مرحله بعد محلول صاف شد و در سه لوله آزمایش ریخته شد، به لوله آزمایش اول پنج قطره ژلاتین ۱ درصد و به لوله آزمایش دوم یک قطره کلریدآهن ۱٪ اضافه شد و لوله آزمایش سوم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ایجاد رسوب در محلول ژلاتین و تولید رنگ سبز یا آبی در محلول کلرید آهن نشان‌دهنده وجود تانن در عصاره است (*Brain & Turner, 1975; Chhabra et al., 1984*).

تشخیص سیانیدین (برای تعیین آنتوسیانین و فلاونوئید)

به منظور شناسایی آنتوسیانین و فلاونوئید موجود در عصاره از سه آزمون به شرح زیر استفاده شد.

آزمون منیزیم: یک گرم عصاره گیاه سه بار با پترولیوم اتر شسته شد تا چربی و رنگ آن از بین برده شود. به عصاره بدون چربی دو میلی‌لیتر مخلوط آب و اتانول (۱:۱) اضافه شد سپس دو میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک غلیظ به محلول اضافه شد، ظهور رنگ قرمز نشانه‌ای بر وجود آنتوسیانین در نمونه گیاهی است. در مرحله بعد یک سر اسپاتول پودر منیزیم به محلول و بعد سه میلی‌لیتر الکل اتیلیک اضافه شد. محلول دو فازی تشکیل خواهد شد، ایجاد رنگ قرمز در فاز بالایی نشان‌دهنده این است که نمونه گیاهی دارای فلاونوئید است و تشکیل رنگ قرمز در فاز زیرین نشان می‌دهد که نمونه گیاهی حاوی آنتوسیانین است، ظهور رنگ قرمز در هر دو فاز این را بیان می‌کند که نمونه گیاهی هم دارای آنتوسیانین و هم دارای فلاونوئید است.

تشخیص فلاونوئید تام: محتوی تام فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیم اندازه‌گیری شد. به این صورت که به نیم میلی‌لیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آلومینیم کلراید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱میلی‌لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیترآب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرستین (ساخت مرک) به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره» گزارش گردید آزمایشات سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد (*Chang et al., 2002*).

تشخیص کل ترکیبات فنلی: محتوی تام فنولیک با استفاده از معرف فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. در این روش به نیم میلی‌لیتر از هر عصاره ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر

1- *Rotary evaporator*

www.SID.ir

Archive of SID

فولین سیوکالتیو اضافه شده، پس از پنج دقیقه، دو میلی‌لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. جذب مخلوط دو ساعت بعد در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج در مقابل بلانک قرائت شد اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت. میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی‌گرم اسید گالیک درگرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد (*Ordonez et al., 2006*).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

بررسی خاصیت توانایی دادن اتم هیدروژن یا *DPPH* آنتی رادیکالی به روش الکترون در ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲ و ۲-دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل یا (*DPPH*) در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد. در این روش به عنوان ترکیب رادیکالی پایدار از ماده عنوان معرف *DPPH* (*Sigma, Aldrich*) سیگما- الدریچ استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و عصارهای آبی، اتانولی، متانولی در متانول به پنج میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد *DPPH* در متانول اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه ذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانو متر با *DPPH* علیه بلانک قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید (*Burits & Bucar, 2000*).

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100 \quad (1)$$

در این معادله، A_{blank}: میزان جذب نوری کنترل منفی که تمامی مواد به استثنای عصاره‌ها و A_{sampl}: بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره‌ها گیاه می‌باشد. پس از آن غلظتی از عصاره‌های گیاه که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰ درصد بود یا (IC_{50})توسط شکل محاسبه گردید. بدیهی است که هر چه این عدد کوچکتر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می‌باشد. در این تست به عنوان کنترل مثبت از *BHT* استفاده گردید و کلیه آنتی‌اکسیدان سنتزی آزمایشات سه بار تکرار شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار *SPSS* نسخه ۱۶ و روش آزمون آنالیز واریانس استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها پنج در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی

ترکیبات طبیعی یا متابولیت‌های ثانویه که غربالگری آن‌ها در عصاره گیاه صورت گرفته است شامل سه دسته از ترکیبات طبیعی معروف تانن، سیانیدین، آلکالوئید می‌باشند. همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، عصاره نمونه‌های مختلف نسبت‌های متفاوتی از فاکتورهای مورد بررسی داشتند. آزمون‌های انجام شده آزمون‌های کیفی به شمار می‌روند که نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود و میزان نسبی ترکیبات مهم فعال در عصاره گیاه هستند. علامت‌های مثبت نشان‌دهنده وجود آن ترکیب و علامت‌های منفی نشان‌دهنده عدم وجود آن ترکیب در عصاره می‌باشد. در این تحقیق آزمایش‌های فیتوشیمی وجود *(+)* سیانیدین، تانن و فلاونوئید را در عصاره و وجود (-) آلکالوئید را در نمونه عصاره تأیید نمود. همان طور که اشاره شد، آزمون استفاده شده برای تشخیص سیانیدین به آزمون شینودا معروف است، این آزمون حضور آنتوسیانین را با رنگ قرمز اثبات می‌کند. در این تحقیق نمونه برداشت شده از کرت با آبیاری ظرفیت زراعی (*FC*) رنگی روشن‌تر نسبت به نمونه‌های برداشت شده از سه کرت دیگر داشت برای ردیابی تانن‌ها از دو معرف کلرید آهن و ژلاتین استفاده شد. در روش کلریدآهن در هر چهار نمونه با ایجاد رنگ سبز لجنی، به آزمون جواب مثبت نشان دادند. در روش ژلاتین رسوب خاصی مشاهده نشد و مقدار آن بسیار ناچیز بود.

ردیابی آلکالوئیدها در نمونه‌ها با کمک دو معرف واگنر و مایر صورت گرفته است. در آزمون واگنر فقط نمونه برداشت شده از کرت با (*FC*۱:۲) به رنگ قرمز درآمد و نمونه‌های بقیه کرت‌ها به آزمون جواب منفی دادند و در آزمون مایر آن‌ها نیز رسوب سفید رنگی حاصل نشد که این نشان‌دهنده عدم حضور آلکالوئید در آن‌هاست.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. آزمون‌های فیتوشیمیایی تیمارهای مختلف عصاره کلاله زعفران

Table 1. Phytochemical tests of different treatments of saffron stigma extract

نمونه‌ها *Samples*	آزمون تانن *Tannin test*		آزمون سیانیدین *Cyanidine test*	آزمون آلکالوئید *Alkaloid test*	آزمون فلاونوئید *Flavonoids test*
	کلرید آهن *Iron chloride*	ژلاتین *Gelatin*			
2/3 FC	+++	+	+++	-	+
FC	+++	+	++	-	+++
1/3 FC	+++	+	+++	-	++
1/2 FC	+++	+	+++	+	+

[+] نشان‌دهنده وجود ترکیب ثانویه موجود است. هرچه تعداد مثبت‌ها بیش‌تر باشد رنگ مورد نظر پررنگ‌تر است.

Indicates the presence of a secondary compound. The higher the number of positive ones, the desired color is more.

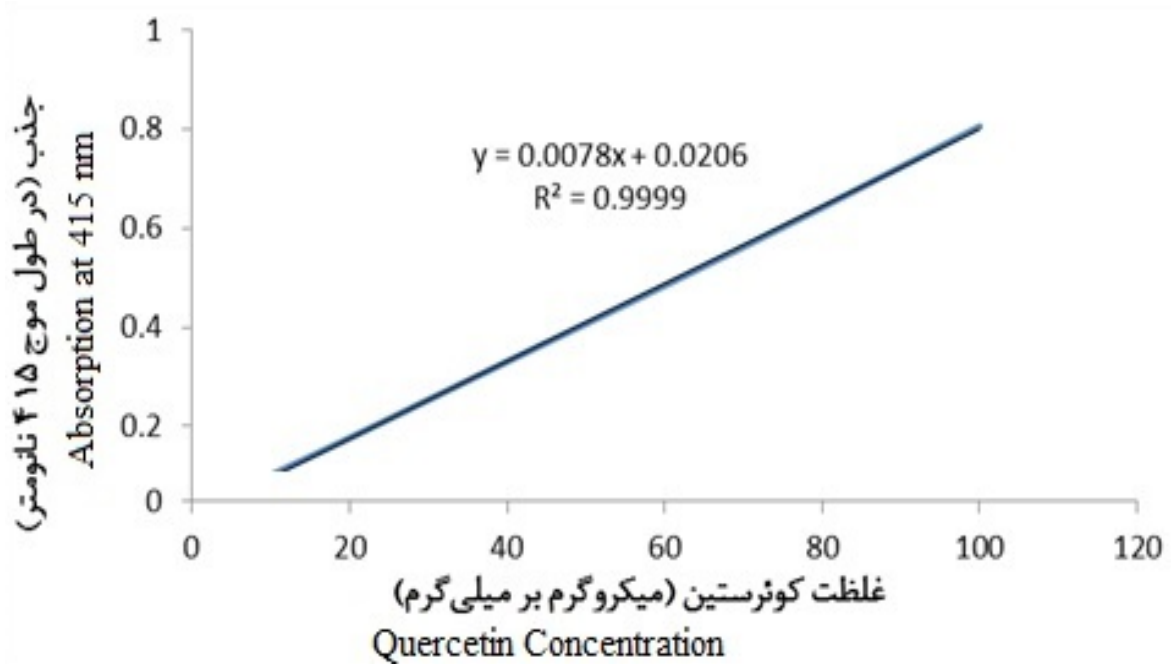
[-] نشان‌دهنده عدم وجود ترکیب گفته شده می‌باشد.

Indicating the absence of the mentioned compound

میزان فلاونوئید تام

سنجش این آزمون با توجه به شکل خطی جذب بر حسب غلظت برای استاندارد کوئرستین در طول موج ۴۱۵ نانومتر انجام شد که در شکل ۱ آورده شده است.

کوئرستین یک فلاونوئید طبیعی اسست که به منظور مهار نیتریک اسید استفاده می‌گردد که اثر سرطان‌زایی آن هم گزارش شده است (*Dunnik & Hailey, 1992*). نتایج حاصل از بررسی ترکیبات فلاونوئیدی در تیمارهای مختلف نشان داد که مقدار فلاونوئید در دو تیمار آبیاری ظرفیت زراعی (*FC*) و *FC*۱:۳ تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند. در بین عصاره‌ها نمونه ۲:۳ ظرفیت زراعی کم‌ترین مقدار فلاونوئید و نمونه ۱:۲ ظرفیت زراعی بیش‌ترین مقدار فلاونوئید را به خود اختصاص داد (شکل ۲).

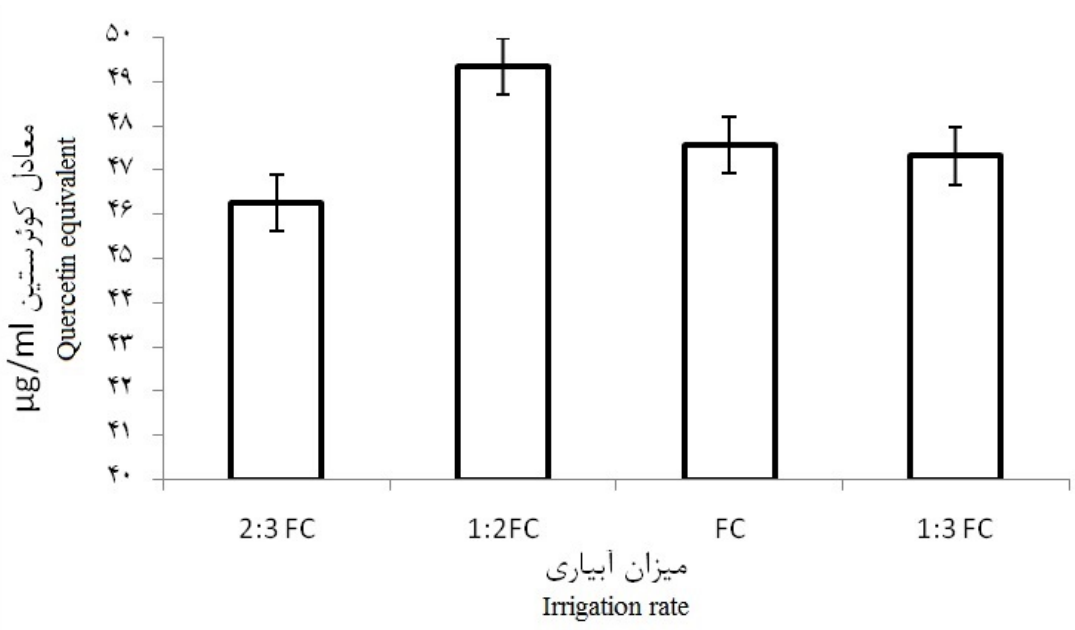


شکل ۱. استاندارد کوئرستین

Fig. 1. Quercetin standard

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. میزان فلاونوئید تام عصاره کلاله زعفران بر حسب معادل کوئرستین در تیمارهای مختلف

***Fig. 2. Total flavonoid content of saffron stigma extract in terms of quercetin equivalent in different treatments*.**

نتیجه بررسی میزان کل ترکیبات فنلی

همان طور که اشاره شد، برای به‌دست آوردن مقدار ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها از آزمون فولین سیکالتو استفاده شد که تعیین کننده میزان کل ترکیبات فنلی گیاه است. جذب محلول شامل عصاره با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حضور معرف فولین، در طول موج مذکور پس از دو ساعت خوانده شد و میزان کل ترکیبات فنلی بر حسب میکروگرم گالیک اسید معادل با یک میلی‌گرم عصاره با توجه به شکل استاندارد محاسبه شد. میزان ترکیبات فنلی خود معیاری از آنتی‌اکسیدانی بودن عصاره‌ها نیز می‌باشد و هر چه این ترکیبات در عصاره‌ها بیش‌تر باشند، عصاره خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری دارند. نتایج این آزمون با توجه به شکل خطی جذب بر حسب غلظت برای استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۰ نانومتر در حضور معرف فولین در شکل ۳ آمده است.

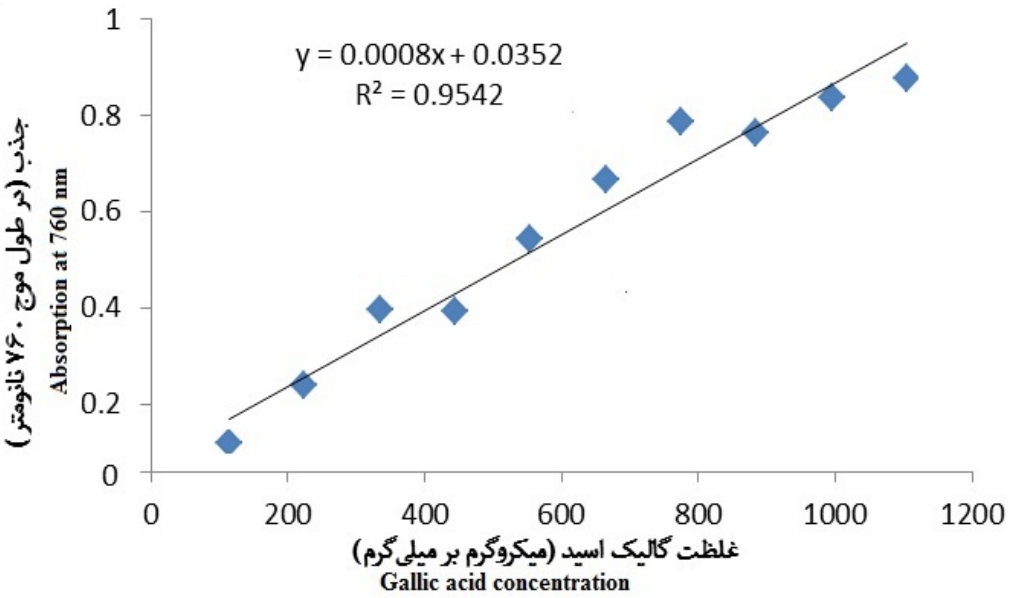
نتایج حاصل از بررسی ترکیبات فنلی معادل گالیک اسید موجود در عصاره‌ها نشان داد، مقدار ترکیبات فنلی در نمونه برداشت شده از کرت آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی (FC) بیش‌ترین و در نمونه برداشت شده از کرت آبیاری شده در حد ۱:۳ ظرفیت زراعی کم‌ترین است. نتایج مربوط به این آزمون در شکل ۴ نشان داده شده است.

نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی

به منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از آزمون مهار رادیکال آزاد $DPPH$ استفاده شد بعد از خواندن جذب محلول هر یک از نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر، درصد مهار رادیکال‌های آزاد $DPPH$ با غلظت ثابت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای هر کدام از نمونه‌ها محاسبه شد (جدول ۲). با توجه به نتایج جدول ۲ همان طور که مشاهده می‌شود در نمونه‌های برداشت شده از کرت آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی (FC)، درصد مهار رادیکال‌های آزاد $DPPH$ آن بیش‌تر است، در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد و به همین ترتیب نمونه‌های برداشت شده از کرت آبیاری شده در حد ۱/۳ ظرفیت زراعی ($1/3FC$) مهار کم‌تری در رادیکال‌های $DPPH$ دارد. تمام نمونه‌ها با غلظت ثابت ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بررسی شدند.

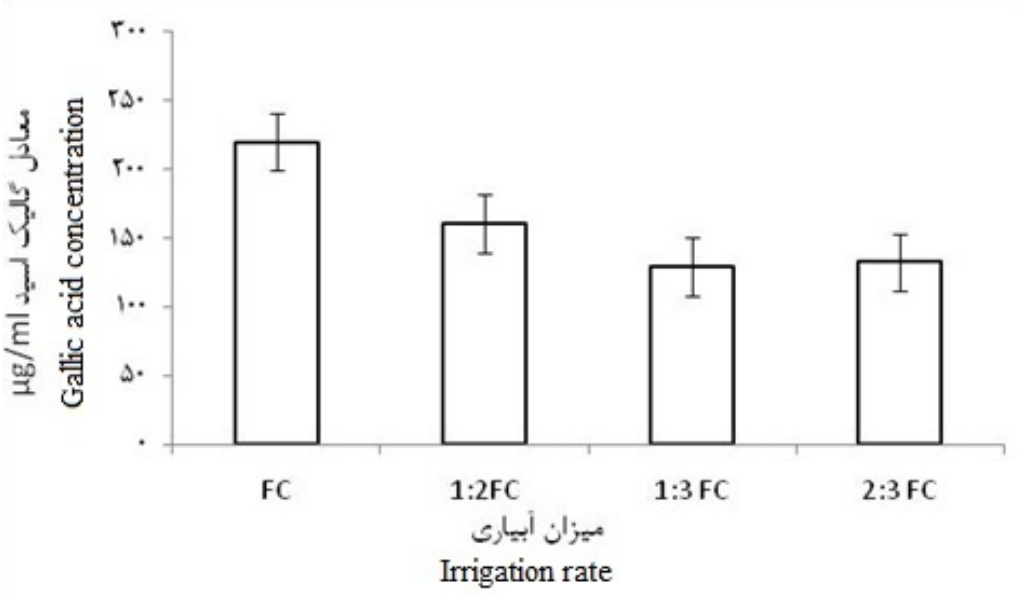
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. شکل استاندارد معادل گالیک اسید

Fig. 3. Gallic acid equivalent



شکل ۴. میزان فنل تام عصاره کلاله زعفران تحت تأثیر تیمارهای مختلف

Fig4. Total phenol content of saffron stigma extract under different treatments

جدول ۲. نتایج آزمون آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله زعفران تحت تأثیر تیمارهای مختلف آبیاری

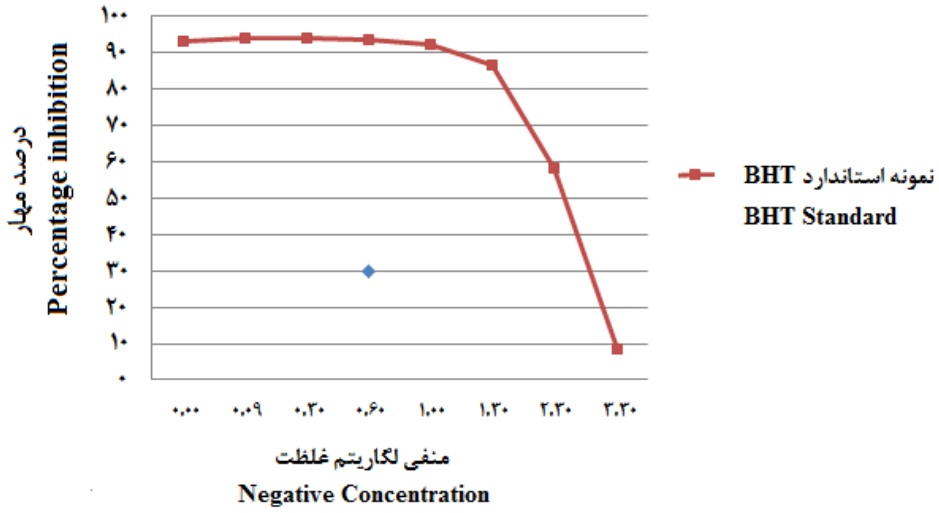
Table 2. Results of antioxidant test of saffron stigma extract under different irrigation treatments

تیمارها *Treatments*	۱/۲ ظرفیت زراعی *1/2 FC*	۱/۳ ظرفیت زراعی *1/3 FC*	۲/۳ ظرفیت زراعی *2/3 FC*	ظرفیت زراعی *FC*
درصد مهارکنندگی *Percentage inhibition*	*86.20±0.1*	*24.76±0.3*	*82.30±0.5*	*92.01±0.5*

www.SID.ir

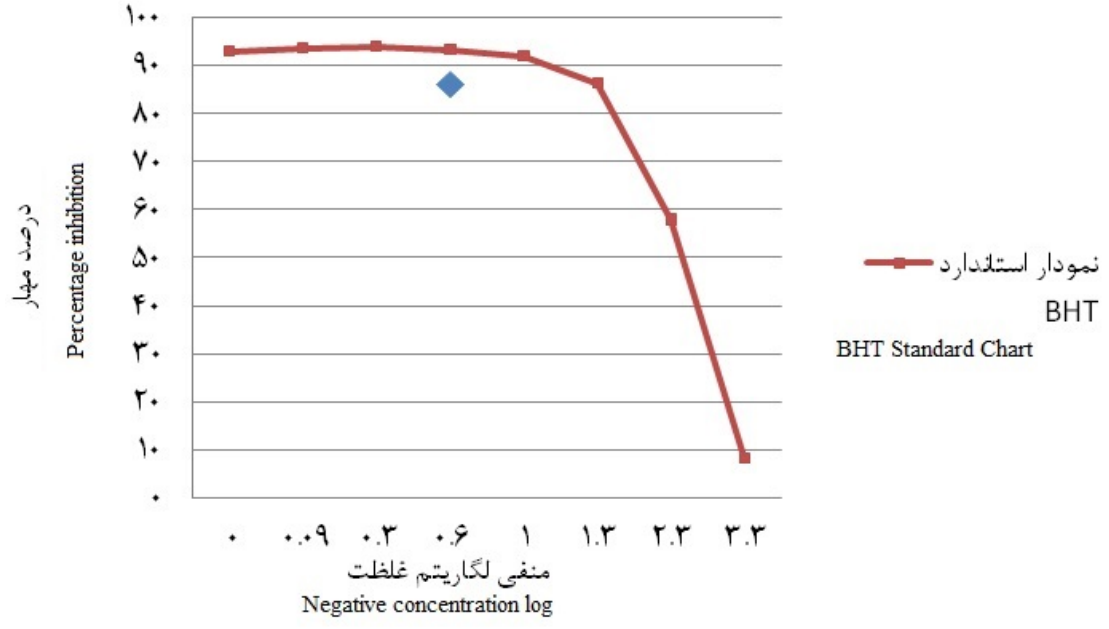
Archive of SID

همچنین با توجه به شکل استاندارد *BHT* میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عصاره بررسی شد و درصد مهار بر حسب منفی لگاریتم غلظت برای تیمارهای مختلف بر روی شکل استاندارد رسم شد، هرچه جواب نمونه‌ها به عدد صد در شکل نزدیک‌تر باشد، درصد مهار رادیکال‌های آزاد در آن بیش‌تر و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن بیش‌تر است (شکل‌های ۵، ۶، ۷ و ۸).



شکل ۵. درصد مهار عصاره کلاله زعفران در تیمار ۱/۳ ظرفیت زراعی روی شکل استاندارد *BHT*

Fig. 5. The percentage of inhibition of saffron stigma extract in a 1/3 filed capacity treatment on the BHT standard curve

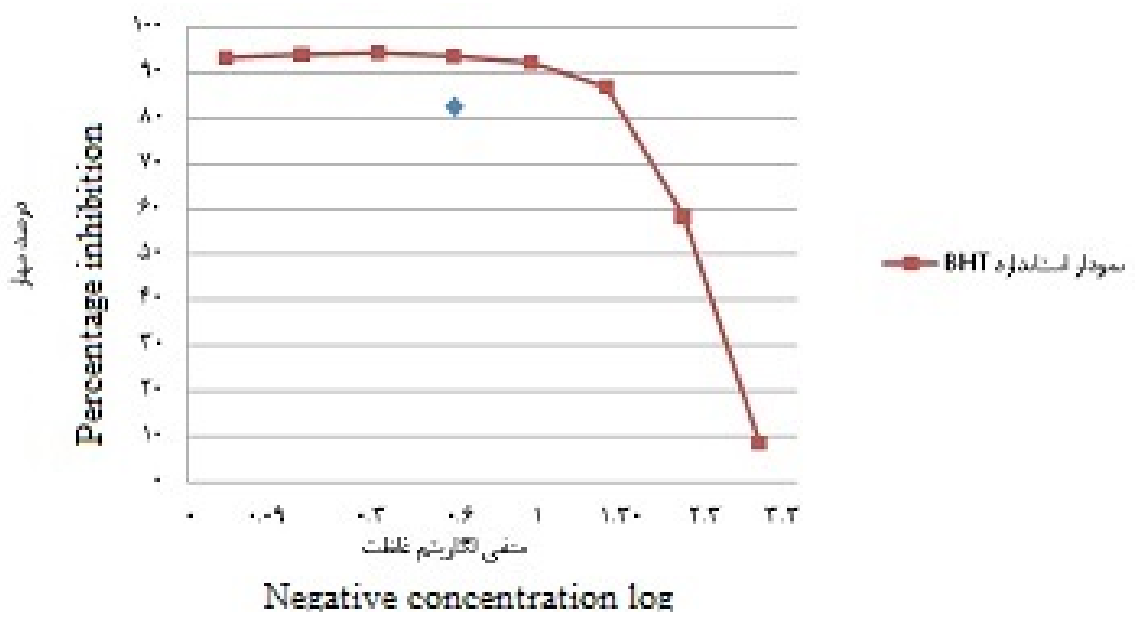


شکل ۶. درصد مهار عصاره کلاله زعفران در تیمار ۱/۲ ظرفیت زراعی روی شکل استاندارد *BHT*

Fig. 6. The percentage of inhibition of saffron stigma extract in a 1/2 filed capacity treatment on the BHT standard curve

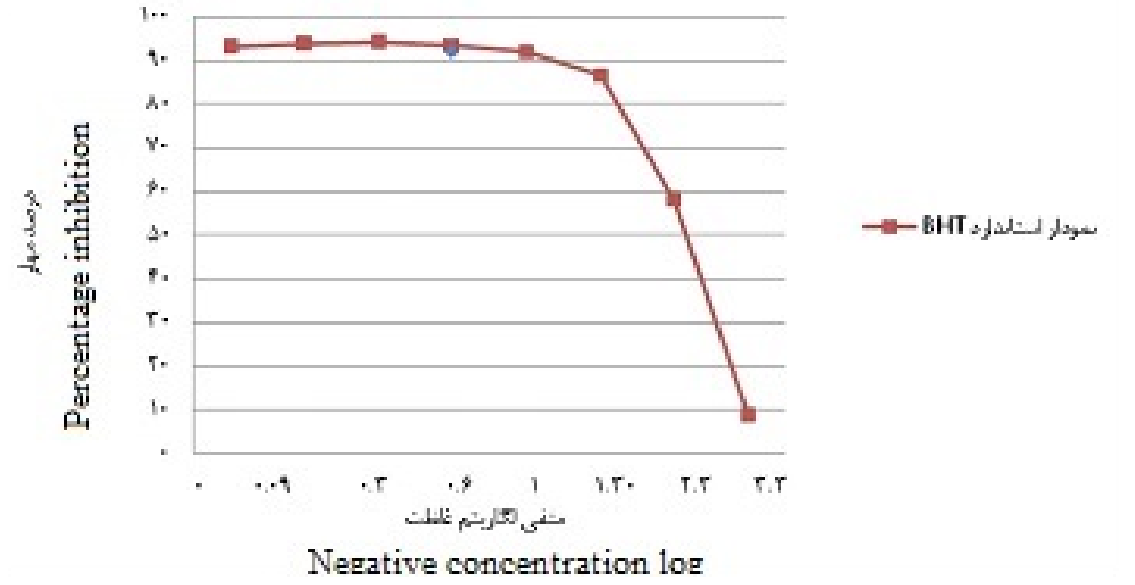
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷. درصد مهار عصاره کلاله زعفران در تیمار ۲/۳ ظرفیت زراعی روی شکل استاندارد *BHT*

Fig. 7. The percentage of inhibition of saffron stigma extract in a 2/3 filed capacity treatment on the BHT standard curve



شکل ۸. درصد مهار عصاره کلاله زعفران در تیمار ظرفیت زراعی روی شکل استاندارد *BHT*

Fig. 8. The percentage of inhibition of saffron tussock extract in a filed capacity treatment on the BHT standard curve

تاکنون در مورد عملکرد عصاره این گونه تحت تیمارهای اعمال شده در این تحقیق، گزارشی وجود ندارد، اما با نتایج تحقیقات دانشخواه و همکاران (*Daneshkhah et al., 2007*) روی بررسی اثر سطوح مختلف تنش بر عملکرد گل و اسانس گل محمدی که نشان داد بیش‌ترین میزان عملکرد عصاره در تنش کم به‌دست آمد، مطابقت دارد. در پژوهش دیگری که در مورد تأثیر تنش خشکی بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه رزماری توسط سایر محققان (*Anwar, 2005; Makkizadeh Tafti et al., 2010*) انجام شد مشخص شد میزان تنش تا ۵۰ درصد می‌تواند باعث افزایش این ترکیبات در گیاه شود.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تحقیق جایمند و همکاران (*Jaymand et al., 2011*) روی بررسی میزان تانن در چند واریته تفاله گلبرگ زعفران مختلف آن نشان داد میزان تانن در تفاله گلبرگ قابل توجه بود. این پژوهش‌ها نشان‌دهنده وجود آنتوسیانین و تانن در کلاله زعفران است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. در این زمینه پاپ و همکاران (*Pop et al., 2007*) بیان کرده‌اند که میزان ماده مؤثره (فلاون‌ها) در گیاه همیشه بهار در تیمار خشکی تنش منجر به کاهش معنی‌دار این ترکیب شده است. در دو نمونه‌ای که سیستم آبیاری متفاوت است، اگرچه که میزان این ترکیبات در نمونه ظرفیت زراعی بیش‌تر است، ولی تفاوت بسیار ناچیزی با نمونه ۱/۳ ظرفیت زراعی دارد.

ولیوگلو و مازا (*Velioglu & Mazza, 1991*) برای جداسازی و اندازه‌گیری فلاونوئید در گلبرگ زعفران همراه با کلاله آن پژوهشی انجام دادند که بیش از ۲۵ پیک ردیابی شدند و ترکیباتی مثل کامفرول و کوئرستین شناسایی شدند که این ترکیبات جز فلاونوئیدها هستند. درباره وجود ترکیبات فنلی در گیاه زعفران پژوهش‌هایی انجام شده است (*Schieber et al., 2005*) در پژوهشی از تقطیر گلبرگ-های گل زعفران به منبعی از ترکیبات فنلی دست یافتند. از آن‌جایی که به جز نمونه ۱/۳ ظرفیت زراعی درصد مهار سه نمونه دیگر با شکل استاندارد *BHT* بسیار نزدیک بوده و نشان از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن‌هاست که این نتیجه با نتایج (*Borrelliet al., 2012; Bidram, 2012*) مطابقت دارد و نشان از اثر آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه این گیاه است.

میزان ترکیبات فنلی و درصد مهار رادیکال‌های آزاد در آزمون آنتی‌اکسیدان رابطه مستقیم با یکدیگر دارند. به همین دلیل در هر دو آزمون مشاهده می‌شود که نمونه برداشت شده از کرت آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی از درصد بالای آنتی‌اکسیدان و مقدار فنل برخوردار است که این امر می‌تواند به دلیل تأثیر رطوبت و متابولیسم بهینه گیاه و در نهایت، تولید ترکیبات فنلی مؤثر در بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمون فیتوشیمیایی وجود ترکیبات ثانویه‌ای مانند تانن، آنتوسیانین و فلاونوئید و عدم وجود آلکالوئید را تایید کرد. در آزمون میزان فلاونوئید تام اگرچه میزان ترکیبات فلاونوئیدی در برخی تیمارها نزدیک به یکدیگر بودند، اما برداشت شده از کرت آبیاری شده در حد ۱/۲ ظرفیت زراعی این مقدار بیش‌تر از سایر نمونه‌ها بود. میزان ترکیبات فنلی و درصد مهار رادیکال‌های آزاد *DPPH* هم نشان از خاصیت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً بالای این گونه است. نمونه برداشت شده از کرت آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی و ۱/۳ ظرفیت زراعی به‌ترتیب بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داده‌اند. سازگاری گیاه زعفران به شرایط آب و هوایی کشور، وجود فرهنگ دیرینه، تولید و مصرف، رونق و تقاضای بازارهای جهانی محصولات ایران و به تبع آن اشتغال‌زایی و ارزآوری از جمله مسائلی است که توجه خاص به این گیاه را می‌طلبد.

منابع

Abdali Mashhadi, A.S., Nabi Pour, M., and Bakhshandeh, A., 2008. Investigating the effects of heading on the quantity and quality of sily marine (Silybum marianum L.) EJCP. 1(2), 1-14. [in Persian with English Summary].

Amanpour, M., 2000. The role of the Ministry of Agricultural in the rehabilitation and development of medicinal plants, with a view to sustainable development, Proceedings of the first conference of traditional medicine, Tehran, Iran. June, p. 134-142. [in Persian].

Amirshekari, H., Sorooshzadeh, A., Modarress Sanavy, A., and Jalali Javaran, M., 2007. Study of effects of root temperature, corm size, and gibberellin on underground organs of saffron (Crocus sativus L.). Iran. J. Biol. 19, 5–18. [in Persian with English Summary].

Anwar, M., Petra, D.D., Chand, S., Alpesh, K., Naqvi, A.A., and Khanuja, S.P.S., 2005. Effect of organic manures and inorganic fertilizer on growth herb and oil yield, nutrient accumulation and quality of French basil. J. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 36(13-14), 1737-1746.

Batooli, B., 2000. Introduction of indigenous and medicinal plants of central section of Iran and Iran-O- Tourani regions.

www.SID.ir

Archive of SID

Proceedings of the First Conference on Traditional Medicine, Tehran, March 2000, p. 98-104. [in Persian].

Bidram, F., 2013. Identify essential components and antioxidant, antimicrobial and anticancer effects of two plants Rosa damascene and Salvia limbata. M.Sc Thesis, of Natural Essential Oil Research Institute University of Kashan, Kashan, Iran. p. 130. [in Persian].

Borrelli, A., 2012. The influence of the water regimes and nitrogen fertilizing on the production of Roses under glass. J. Rivista Della Orto Florofuettioli. 65, 109-117.

Brain, K.R., and Turner, T.D., 1975. The Practical Evaluation of Phytopharmaceuticals. Bristol: Wright-Scientechnica, p. 10-30.

Burits, M., and Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. J. Phytother. Res. 14, 323-328.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., and Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in proplis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug. 10, 178-182.

Chhabra, S.C., Uiso, F.C., Mshiu, E.N., 1984. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 11, 157-179.

Danshkhvah, M., Kafi, M., Nikbakht, A., and Mirjalili, M.H., 2007. Effect of nitrogen and potassium on performance indices and Rosa damascene Mill. linseed flowers Kashan. J. Hortic. Sci. Technol. 8(2), 90-83.

Dunnik, J.K., and Hailey, J., 1992. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. J. Toxicol. Sci. 19(3), 423-431.

Forouzeh, M., 2005. Investigation of the effect of flood spreading in desert areas on aerial parts of plants with multifunctional properties. Proceedings of the 2nd Conference on Watershed Management and Water and Soil Management. Kerman, March, p. 651-656.

Henry, C., and Heppell, N., 2002. Nutritional losses and gains during processing: future problems and issues. Nat. Sci. 61, 145-148.

Jaimand, K., Rezaei, M.B., Asareh, M.H., Tabaei Aghdaie, R., and Moshky zadeh, S., 2010. Extraction and determination of Kaempferol and Quercetin in petals of 10 genotypes of Rosa damascena Mill. from western Iran. Iran. J. Medic. Arom. Plant Res. 25(4), 547-555. [in Persian with English Summary].

Jaimand, K., Rezaei, M.B., Tabaei Aghdaie, R., Naderi Hajibagheri Kennedy, M., and Moshky Zadeh, S., 2011. Determination of tannin content in Rose water, wastewater and trash of rose (Rosa damascene Mill.). Iran. J. Medic. Arom. Plant. Res. 27(2), 348-357. [in Persian with English Summary].

Jamshidi, M., Ahmadi, H.R., Rezazadeh, S., Fathi, F., and Mazanderani, M., 2010. Study on phenolic and anioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. Iran. J. Medic Arom. Plant. 9(34), 177-183. [in Persian with English Summary].

Karimi, H., 2005. Culture of Iranian plants. Volume II. Parcham Publication, 450p.

Koocheki, A., and Seyyedi, S.M., 2015. Phonological stages and formation of replacement corms of saffron (Crocus sativus L.) during growing period. J. Saffron Res. 3(2), 134-154. [in Persian with English Summary].

Kowsar, A., 1993. Desertification with flood spreading: Coordinated effort. Fars Natural Resources and Animal Resources Research Center, Shiraz, Iran. p. 58. [in Persian].

Makkizadeh Tafti, M., Chaiechi, M.R., Nasrollahzadeh, S., and Khavazi, K., 2011. Evaluate the effect of nitrogen fertilizers on growth and yield of biological and chemical dill (Anethum graveolens L.). J. Knowl. Sustain. Agric. Prod. 21(4), 62-51. [in Persian with English Summary].

Mesbah, H., 2001. Study of the effect of flood spreading on quantitative and qualitative changes of vegetation of Fasa grabiana. Final Report of Research Project, Fars Agricultural and Natural Resources Research Center, Shiraz, Iran. P. 56. [in Persian with English Summary].

Miraskar Shahi, F., 2002. Study of non-structural carbohydrate changes in three species of rangeland in Zardin Nir region

www.SID.ir

Archive of SID

of Yazd province, Master's degree in Commodity. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. p. 103. [in Persian with English Summary].

Moghaddam, M., 1998. Rangeland and Rangeland Management. First edition, Tehran University Press, Tehran, Iran. p. 470. [in Persian].

Mosadaghi, M., 2003. Rangeland and Rrangeland Management in Iran. Astan Quds Razavi Publishing, Imam Reza University, Mashhad, Iran. p. 333. [in Persian].

Mousavi, S.H., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., and JafariAnarkooli, I., 2009. Role of caspases and Bax protein in saffron induced apoptosis in MCF-7 cells. J. Food Chem. Toxicol. 47(8), 1909-1913.

Omidbeigi, R., 2000. Iran's ability to produce medicinal plants. Iran. J. Medic. Plant. 39, 52-67. [in Persian with English Summary].

Ordoñez, A., Gomez, J.D., Vattuone, M.A., and Isla, M.I., 2006. Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq) Swartz extracts. J. Food Chem. 97, 452-458.

Pop, G., Pirsan, P., Mateoc-sirb, N., and Mateoc, T., 2007. Influence of technological elements on yield quantity and quality in marigold (Calendula officinalis L.) cultivated in cultural conditions of Timisoara. J. Arom. Spice Plant. 5(6), 20-23.

Raghavendra, H., Vijayananda B., Madhumathi G., and Hiremath A., 2010. In vitro antioxidant activity of Vitex negundo L. Leaf extracts. Chiang Mai J. Sci. 37(3), 489-497.

Rahimi, A., Jahansouz, M., Rahimian Mashhadi, H., Pooryousef, M., and Roota, H., 2009. Effect of drought and plant density on yield and developmental stages of both Psyllium species using degree day growth. EJCP. 2(1), 57-84. [in Persian with English Summary].

Ramesh, P., and Okigbo, R.N., 2008. Effects of plants and medicinal plant combinations as anti-infectives. J. Afric. Pharmacy Pharmacol. 2(7), 130-135.

Rezaei, M., Jaimand, K., Tabaei Aghdaie, R., and Barazandeh, M., 2002. Comparison of laboratory and industrial samples in terms of quantity and quality Rosa damascene Mill. major combinations of Kashan. Iran. J. Medic. Arom. Plant. 19, 72-63. [in Persian with English Summary].

Schieber, A., Mihalev, K., Berardini, N., Mollov, P., and Carle, R., 2005. Flavonol Glycosides from distilled petals of Rosa damascene Mill. Zeitschrift fur Natuforschung. J. Boisci. (C). 60, 379-84.

Shahrokhi, N., 1996. Methods of Quality Control of Traditional Medicine. Shahid Beheshti University Press, Tehran, Iran, 287 p. [in Persian].

Velioglu, Y.S., and Mazza, G. 1991. Characterization of flavonoids in petals of Rosa damascene by HPLC and spectral analysis. J. Agric. Food Chem. 39, 463-467.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Saffron Research (semi-annual)
Vol.7, No.1, Spring & Summer, 2019
p. 109-122
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2018.1006.1042

University of Birjand

Original Article:

Effect of Irrigation Regimes on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Saffron Stigma Extract

Reza Dehghani Bidgoli[1*], Amir Salary[2] and Mahdi Bashiri[3]
1- Assistant Professor, Department of Rangeland and Watershed Management, College of Natural Resources and Earth Sciences, University of Kashan, Iran
2- Department of plant production, Faculty of Agriculture and Natural Resources and Saffron Institute University of Torbat Heydarieh, Iran
3- Assistant Professor, Department of Nature Engineering and Medicinal Plants, Faculty of Natural Resources, University of Torbat Heydarieh, Iran.
**Corresponding author E-mail: dehghanir@kashanu.ac.ir*

Received 20 September 2017; Accepted 8 October 2018

Abstract
Environmental factors such as plant nutrition and available moisture content affect the quantity and quality of plants compounds, including phenolic compounds such as flavonoids, tannins and anthocyanins contents. Saffron is one of the indigenous medicinal plants of Iran, whose history of using it is back to the ancient times. The present study was carried out to investigate the quantitative and qualitative properties of phenolic compounds and antioxidant activity of saffron tussock extract under the influence of irrigation regimes based on field capacity (FC), 1/2FC, 1/3FC and 2/3FC. At the first, saffron corms were cultivated based on a completely randomized design and then phytochemical contents were measured. Afterwards the total phenolic and flavonoid compounds were measured by spectrophotometry method. Finally, the antioxidant activity of the extract at different concentrations was measured using 2, 2 diphenyl-1-picriyl-hydrazil (DPPH) radical inhibitory activity. The results of the phytochemical test confirmed the presence of secondary compounds such as tannin, anthocyanin and flavonoids, and the absence of alkaloids in the saffron tussock extract. Also, the flavonoid content of the irrigated sample with 50% FC was higher than the other treatments. The sample that irrigated to the extent of FC level and sample was irrigated to the extent of 1/3FC level showed the highest and lowest amount of phenolic compounds, respectively and sample was irrigated to the extent of FC showed the most antioxidant properties.

***Keywords:** Extract, Field capacity, Flavonoid, Phytochemical test*

www.SID.ir