بررسی اثر ضد تومور و سیتوتوکسیسیتی کلاله و گلبرگ زعفران به روش دیسک سیب‌زمینی و میگوی آب شور

حسین حسین‌زاده[1]*، جواد بهروان[2]، محمد رمضانی[2]، خدیجه اژکان[3]

۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی علوم دارویی و دانشکده داروسازی مشهد

۳- داروساز

*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق پستی ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵، تلفن: ٦٦-۸۸۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)

نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: hosseinzadehh@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۲/۱۱/۱٤ **تاریخ تصویب:** ۸٤/۲/٤

چکیده

مقدمه: تحقیقات فراوانی اثر ضدسرطانی کلاله زعفران را نشان داده است.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی سمیت و اثر ضدتوموری عصاره‌های خیسانده الکلی کلاله و گلبرگ زعفران به روش‌های ساده میگوی آب شور و سنجش دیسک سیب‌زمینی با میکروب اگروباکتریوم تومه فشنز بود.

روش بررسی: برای بررسی فعالیت ضدباکتری اگروباکتریوم تومه فشنز توسط عصاره‌ها آزمون MIC به روش میکروپلیت انجام گرفت. در روش بررسی اثر ضد توموری، دیسک‌های سیب‌زمینی با قطر مشخص زیر هود لامینار به آگار ۱/۵ درصد منتقل شد. ۵۰ میکرولیتر از مخلوط سوسپانسیون اگروباکتریوم و محلول عصاره‌های کلاله و گلبرگ زعفران به روی دیسک‌های سیب‌زمینی قرار داده شده در پلیت تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۱ روز انکوبه شد تا تومورهای حاصل بر روی دیسک‌ها شمارش شود. در روش میگوی آب شور برای باز کردن تخم‌های میگو محیط مناسب آب دریای مصنوعی تهیه و شرایط لازم برای باز کردن تخم‌ها فراهم شد. پس از انجام آزمون به روش استاندارد با توجه به تعداد مرگ و میر میگوها غلظت‌های مناسب ثانویه نیز تهیه و نتایج بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره گلبرگ در غلظت‌های mg/ml ۱۶-۱ خاصیت ضدباکتری بر علیه اگروباکتریوم تومه فشنز نداشت و MIC عصاره کلاله mg/ml ۱۰ محاسبه شد. IC_{50} به دست آمده در مهار رشد تومورهای ناشی از اگروباکتریوم تومه فشنز برای عصارهٔ کلاله mg/ml ۵/۳ و عصاره گلبرگ mg/ml ۱۰/۸ تعیین شد. LC_{50} عصاره‌های الکلی کلاله و گلبرگ در روش میگوی آب شور به ترتیب ppm ۱٦۷۸/۷ و ppm ۱۳۵٦/۸ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کلاله توانایی بیشتر در مهار رشد توموری نسبت به گلبرگ دارا می‌باشد و کلاله دارای سمیت کمتری نسبت به گلبرگ است.

گل‌واژگان: کلاله و گلبرگ زعفران، آنتی تومور، میگوی آب شور، دیسک سیب‌زمینی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سرطان به عنوان بزرگترین عامل مرگ در جهان باقی‌مانده و منجر به مرگ بیش از ٦ میلیون نفر در هر سال می‌شود [١]. شواهد رو به رشدی در دست است که نشان می‌دهند کاروتنوییدها[1] دارای اثرات ضد سرطان‌زایی، ضد جهش‌زایی و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی می‌باشند [٢].

زعفران که از کلاله‌های خشک شده گیاه زعفران[2] گرفته می‌شود از جمله گونه‌هایی است که سرشار از کاروتنوییدها می‌باشد و در مناطق مختلف جهان عموماً مصرف می‌شود. زعفران (*Crocus sativus* L.) از جمله گیاهان دارویی است که در طب سنتی به کابردهای متعدد آن از جمله ضداسپاسم، کمک به هضم طبیعی غذا، تسکین‌دهنده لثه، ضدنفخ، افزایش‌دهنده تعریق، مقوی معده، محرک تمایلات جنسی، خلط‌آور، ضد آبریزش و ایجاد قاعدگی زودرس می‌توان اشاره کرد [٣]. علاوه بر این مطالعات فارماکولوژیکی جدید نشان می‌دهند که عصاره زعفران دارای اثرات ضدتومور، جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد و پایین‌آورندگی چربی خون می‌باشد [٣]. عصاره آبی و الکلی زعفران تشنج ناشی از پنتیلن تترازول و الکتروشوک را در موش مهار کرد [٤]. عصاره‌های کلاله و گلبرگ زعفران همچنین اثرات ضدالتهابی، ضددردی و نیز ضدافسردگی در مدل‌های حیوانی از خود نشان دادند [٥،٦].

برای نخستین بار Nair و همکارانش اثرات ضدسرطانی عصاره زعفران را علیه طیف وسیعی از تومورهای موشی و کشت سلول‌های لوسمی انسانی گزارش دادند [٢]. نشان داده شده که عصاره زعفران قادر به مهار یا کند کردن روند ایجاد تومور در انواع مختلفی از مدل‌های آزمایشگاهی به روش داخل بدنی است [٧،٨]. کاروتنوییدهای طبیعی گرفته شده از زعفران مانند کروسین و کروستین اثرات مهاری بر روی رشد و القای تمایز سلول‌ها در لوسمی از خود نشان داده‌اند [٩].

در این تحقیق اثر ضدتومور عصاره الکلی کلاله و گلبرگ زعفران به روش برون‌تنی ساده‌ای یعنی سنجش دیسک سیب‌زمینی با میکروب اگروباکتریوم تومه فشنز بررسی شد و همچنین سمیت سلولی به روش میگوی آب شور مورد تحقیق قرار گرفت. هدف اصلی این تحقیق تثبیت اثر ضدسرطانی کلاله زعفران به یک روش ساده و همچنین برای اولین بار اثر ضدتومور گلبرگ زعفران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه زعفران

گیاه زعفران در آبان ماه ١٣٨٠ از زمین‌های کشاورزی مشهد جمع‌آوری شد (کد هرباریوم ١٤٣-٠٣١٩-٠١). خشک کردن گیاه تحت شرایط سایه و دور از نور صورت گرفت.

تهیه عصاره

از روش خیساندن استفاده شد. ٤ و ٥ گرم به ترتیب از کلاله و گلبرگ زعفران پودر شد. آنگاه داخل ظرف شیشه‌ای تیره ریخته و به آن ٥٠٠ میلی‌لیتر اتانول ٨٠ درجه افزوده شد. بعد از ٢٤ ساعت محتویات ظرف به مدت ٥ دقیقه با سرعت ٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوبات جدا شد. با کمک دستگاه حذف حلال در خلا و در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد اتانول حذف شد.

بررسی فیتوشیمی [١٠،١١]

الف- تشخیص فلاونویید

٠/٢٥ گرم از پودر گیاه (کلاله و گلبرگ زعفران) با ١٢/٥ میلی‌لیتر متانول به مدت چند دقیقه جوشانده شد و سپس محلول صاف گردید. به محلول صاف شده ٤ میلی‌لیتر اتردوپترول (جهت ناخالصی‌های محلول در چربی) در قیف دکانتور افزوده و عمل استخراج انجام شد. این عمل سه بار تکرار شد. مقدار ١ تا ٢ میلی‌لیتر از فاز متانولی را در دو لوله آزمایش ریخته و سپس به هر یک از لوله‌ها ٠/٠٥ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ اضافه شد. به یکی از لوله‌ها ٢٠٠ میلی‌گرم براده منیزیم افزوده و لوله دیگر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ایجاد رنگ نارنجی تا قرمز در کف لوله‌ای که براده منیزیم افزوده شده نشان دهنده وجود فلاونویید است.

[1] carotenoids [2] *Crocus sativus* L.

Archive of SID
www.SID.ir

ب- تشخیص آلکالوئید

به ۰/۲۵ گرم از عصاره‌ها ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ درصد اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه جوشانده و سپس حجم به میزان اولیه رسانده شد و محلول اسیدی حاصل صاف گردید. محلول حاصل توسط مقدار مناسب آمونیاک ۱۰ درصد قلیایی و با اتیل اتر استخراج گردید.

محلول اتری تا حد خشک تبخیر و به آن ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ درصد افزوده شد. سپس محلول اسیدی حاصل به سه قسمت تقسیم گردید. یک قسمت به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به دو قسمت دیگر معرف بوشاردا و مایر اضافه گردید.

تشکیل رسوب قهوه‌ای رنگ با افزودن معرف بوشاردا و رسوب سفید مایل به زرد با افزایش معرف مایر نشان‌دهنده وجود آلکالوئید است.

ج- تشخیص تانن

۰/۲۵ گرم عصاره کلاله و گلبرگ زعفران در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به محلول عصاره‌ها ٤-۳ میلی‌لیتر سدیم کلراید ۱۰ درصد افزوده شد. دو قطره کلرورفریک ۵ درصد در یک لوله آزمایش به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. سپس چند قطره از محلول عصاره‌ها به لوله آزمایش اضافه گردید.

ایجاد رنگ سبز متمایل به آبی نشان دهنده وجود تانن است.

د- تشخیص ساپونین

۰/۲۵ گرم عصاره در لوله آزمایش ریخته و در مقداری آب مقطر حل و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شد. ثابت ماندن کف به مدت نیم ساعت نشان‌دهنده حضور ساپونین است.

ه- تشخیص آنتوسیانین

مقداری عصاره در آب مقطر حل نموده و محلول حاصل به وسیله اسید کلریدریک اسید شد. حضور رنگ قرمز در pH ٤-۳ و تغییر رنگ با تغییرات pH نشان‌دهنده وجود آنتوسیانین می‌باشد.

آزمون دیسک سیب‌زمینی [۱۲]

پس از شستشو، سیب‌زمینی در هیپوکلریت سدیم w/v ۰/۱ به مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور و ضدعفونی شد و تحت هود لامینار دیسک‌هایی به قطر ۱/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۰/۵ سانتی‌متر از سیب‌زمینی‌ها تهیه شد. دیسک‌های سیب‌زمینی تهیه شده به پلیت حاوی آگار (۱/۵درصد) منتقل و در هر پلیت پنج دیسک قرار داده شد. برای هر غلظت از عصاره‌های گیاه سه تا پنج پلیت حاوی دیسک تهیه شد.

پس از کشت باکتری اگروباکتریوم تومه فشنز (ATCC 23341) در محیط Soybean Casein Digest Agar، توسط سمپلر باکتری (10^8 CFU/ml) بر روی دیسک‌های سیب‌زمینی تلقیح شد. سپس پلیت‌های حاوی دیسک به مدت ۲۱ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت تومورها بر روی دیسک‌های سیب‌زمینی با محلول لوگول آغشته و شمارش شدند. تومورها به دلیل نشاسته خیلی کم در برابر لوگول بی‌رنگ ولی بافت سیب‌زمینی آبی پررنگ می‌شود. درصد مهار رشد نسبت به گروه کنترل منفی (سوسپانسیون میکروبی همراه آب مقطر) سنجیده به صورت IC_{50} محاسبه شد.

آزمون میگوی آب شور [۱۲]

تخم میگو داخل پلیت حاوی آب دریای مصنوعی در انکوباتور ۲۵ درجه به مدت ٢٤ ساعت قرار داده شد. پس از تبدیل تخم‌ها به لاروها، ۱۰ عدد لارو زنده به پلیت منتقل و در مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه قرار داده شد. غلظت‌های مختلف از عصاره را در حفره های پلیت ریخته و یک حفره بدون عصاره به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. درصد مرگ و میر به صورت LC_{50} بر روی لارو ٢٤ ساعته محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت عصاره‌ها در مهار رشد اگروباکتریوم تومه فشنز

اثر ضدمیکروبی احتمالی عصاره‌ها بر روی میکروب اگروباکتریوم به روش میکروپلیت و در محیط کشت Nutrient Broth صورت گرفت. جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز آماری

جهت تعیین LC_{50} و IC_{50} از برنامه نرم‌افزاری .Pharm PCS استفاده شد و توسط این برنامه مقایسه شد.

نتایج

آزمایش‌های فیتوشیمی وجود آلکالوییدو ساپونین در کلاله و آنتوسیانین، آلکالوییدو، تانن و فلاونوییدرا در گلبرگ تایید نمودند (جدول شماره ۱).

عصاره‌های الکلی گلبرگ در محدوده غلظت اثر ضدتوموری، اثر ضدمیکروبی بر علیه اگروباکتریوم تومه فشنز از خود نشان ندادند. حداقل غلظت مهار باکتری عصاره کلاله ۱۰ mg/ml بود. چاهک‌های حاوی شاهد مثبت (محلول جنتامایسین ۵ mg/ml همراه سوسپانسیون اگروباکتریوم تومه فشنز) شفاف بود.

IC_{50} عصاره‌های الکلی گلبرگ و کلاله برای مهار رشد تومورهای تاجی شکل دیسک سیب‌زمینی ناشی از اگروباکتریوم تومه فشنز (شکل شماره ۱) به ترتیب (۱۲/۱٤–۹/۲٤) ۱۰/۵۹ mg/ml و (٤/۷٦–۵/۹) ۵/۳ mg/ml بود. اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی گلبرگ و کلاله در مهار رشد تومور وابسته به دوز بود (شکل شماره ۲). وین‌کرستین به عنوان کنترل مثبت با غلظت ۰۸/ mg/ml ۰ باعث مهار کامل رشد تومور شد.

LC_{50} عصاره الکلی گلبرگ و کلاله در مرگ و میر لاروها میگو به ترتیب (۱٤۲۹/۱–۱۲۸۸/۰) ppm ۱۳۵٦ و (۱۷۷۰/۹–۱۵۹۱/۲) ppm ۱٦۷۸/۷ بود (شکل شماره ۳). IC_{50} و LC_{50} عصاره‌های کلاله و گلبرگ زعفران تفاوت معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) داشتند.

بحث

براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، عصاره‌های الکلی کلاله و گلبرگ زعفران به روش دیسک سیب‌زمینی باعث کاهش تعداد تومورهای ایجاد شده از اگروباکتریوم تومه فشنز در دیسک‌های سیب‌زمینی شدند و اثر ضدتوموری با این روش نشان دادند. در این مطالعه عصاره کلاله اثر بیشتری در مهار رشد توموری نسبت به عصاره گلبرگ نشان داد و مهار رشد توموری عصاره‌های کلاله و گلبرگ وابسته به دوز بود. در بررسی سمیت به روش میگوی آب شور، گلبرگ سمیت بیشتری نشان داد ولی در مجموع هر دو عصاره سمیت قابل ملاحظه‌ای بر روی میگوی آب شور ندارند.

مطالعه سمیت حاد

در این مطالعه به منظور اندازه‌گیری سمیت حاد کلاله و گلبرگ زعفران، میزان مرگ و میر لارو میگوی آب شور در تماس با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. هر بار لاروها در شرایط استاندارد از جهت دما، مدت زمان و نیز غلظت نمک آب شور دریا نگهداری شد. LC_{50} به دست آمده با این روش برابر عصاره الکلی کلاله ppm ۱٦۷۸/۷ و در مورد عصاره الکلی گلبرگ ppm ۱۳۵٦/۷ می‌باشد. طبق تحقیقات به عمل آمده سمیت قابل ملاحظه در روش میگوی آب شور وقتی در نظر گرفته می‌شود که LC_{50} آن کمتر از ppm ۱۰۰۰ باشد [۱۲]. با توجه به نتایج که LC_{50} های به دست آمده بالای ppm ۱۰۰۰ است می‌توان گفت این عصاره‌ها در غلظت‌های پایین سمیت قابل ملاحظه‌ای بر روی میگوی آب شور ندارند و جزو مواد دارای سمیت کم به حساب می‌آیند.

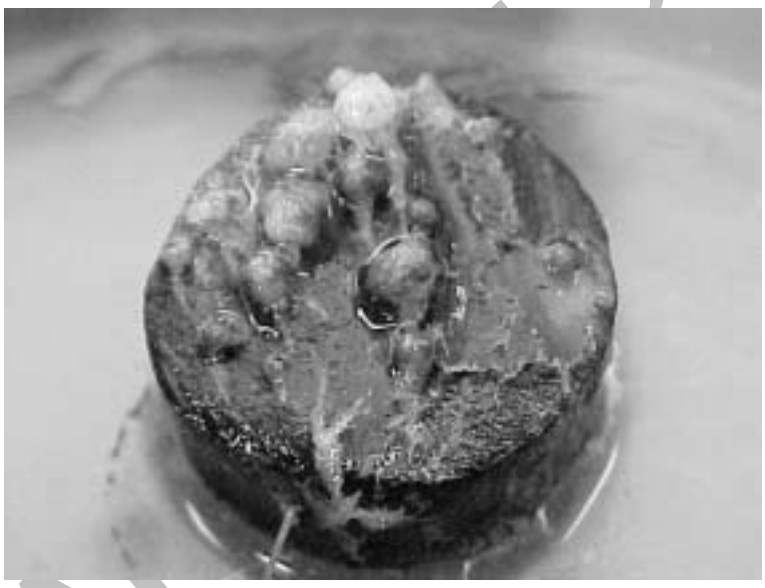
بررسی نتایج مهار رشد توموری در سنجش دیسک سیب‌زمینی

در سنجش دیسک سیب‌زمینی اثر ضدتوموری براساس کاهش ۲۰ درصد و بالاتر از آن در تعداد تومورهای ناشی از اگروباکتریوم تومه فشنز نسبت به دیسک کنترل منفی مشخص می‌شود و برای اینکه نتایج قابل قبول باشد باید در تمام غلظت‌های عصاره‌های تهیه شده تقریباً تعداد مشخص باکتری (10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر) وجود داشته باشد. باید توجه داشت عصاره‌های تهیه شده در غلظت‌های مورد بررسی باعث مرگ باکتری نشود زیرا در غیر این صورت نتایج منفی کاذب ایجاد می‌گردد.

طبق MIC به دست آمده برای عصاره الکلی حداقل غلظت مهار رشد آن mg/ml ۱۰ تعیین شده، بنابراین بررسی کاهش تعداد تومورها در غلظت‌های کمتر از mg/ml ۱۰ مطمئن‌تر خواهد بود.

Archive of SID
www.SID.ir

الف



ب

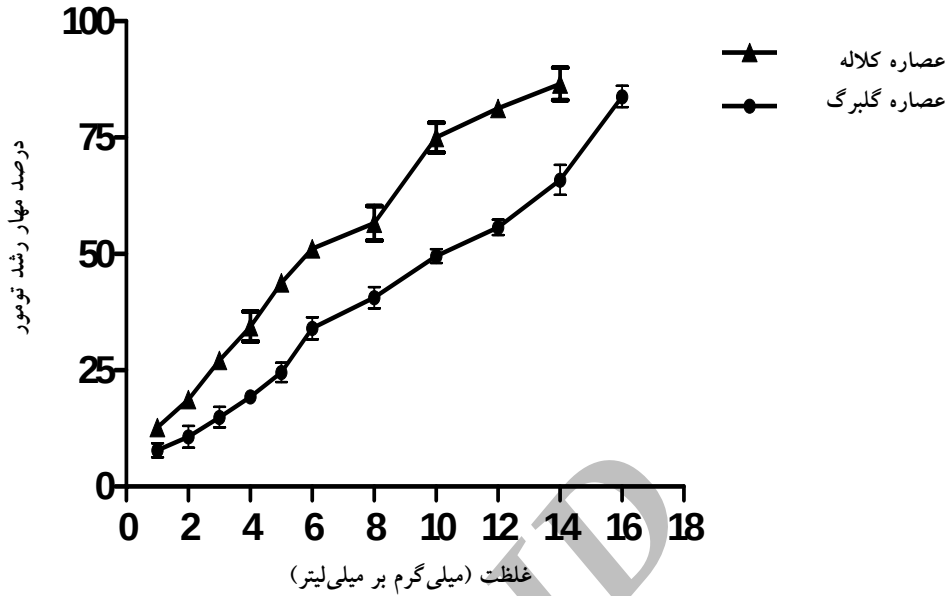
شکل شماره ۱- نمایش تومورهای تاجی شکل حاصل از آگروباکتریوم تومه فشنز بر دیسک سیب‌زمینی قبل (الف) و بعد (ب) از رنگ‌آمیزی با لوگل

جدول شماره ۱- بررسی فیتوشیمی عصاره الکلی کلاله و گلبرگ زعفران

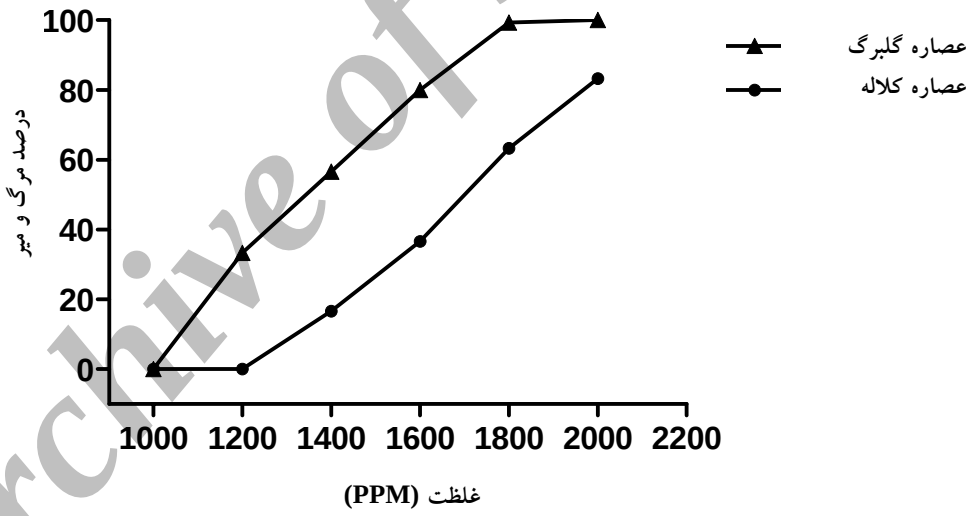
اندام گیاه	آنتوسیانین	آلکالویید	تانن	ساپونین	فلاونویید
کلاله	–	+	–	+	–
گلبرگ	+	+	+	–	+

+ و – به ترتیب وجود و عدم وجود ترکیب شیمیایی

www.SID.ir



شکل شماره ۲- درصد مهار رشد توموری ناشی از اگروباکتریوم تومه فشنز توسط عصاره الکلی کلاله وگلبرگ زعفران. هر نقطه مبین میانگین درصد مهار رشد + SD می‌باشد. تعداد دیسک‌های سیب‌زمینی مورد مطالعه در هر غلظت ۱۲ عدد می‌باشد که میانگین درصد مهار نسبت به کنترل منفی سنجیده شده است.



شکل شماره ۳- درصد مرگ و میر لاروها آرتمیا در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره الکلی کلاله و گلبرگ زعفران، هر نقطه مبین اثر بر روی ۳۰ میگو می‌باشد.

عصاره الکلی گلبرگ خاصیت ضدباکتری تومه فشنز نشان نداد در نتیجه در بررسی نتایج محدودیتی ایجاد نمی‌کند.

در مطالعه‌ای که اثر ضدسرطانی عصاره الکلی کلاله بر روی سلول‌های سرطانی انسان[1] بررسی شده، LC_{50} بر روی سلول‌های سرطانی ۲/۳ mg/ml بوده و ۳ میلی‌مولار برای کروسین، ۰/۸ میلی‌مولار برای سافرانال و ۳ میلی‌مولار برای پیکروکروسین گزارش شده است. در این تحقیق کروسین به عنوان مهمترین ماده ضدسرطانی معرفی شده است [۱۳].

کروسین جزء گلیکوزیدهای کاروتنوییدی بوده و محلول در آب و الکل می‌باشد. در مطالعه دیگر اثر کروسین، کروستین و دی‌متیل کروستین در مهار رشد و القای تمایز سلولی لوسمی پرومیلوستیک بررسی شده است که IC_{50} به دست آمده

[1] Hela cell

Archive of SID
www.SID.ir

کروستین (۲ میکرومولار) و دی‌متیل کروستین (۰/۸ میکرومولار) و کروسین (۲ میکرومولار) بوده است [۹].

با مقایسه نتایج ذکر شده دیده می‌شود که محدوده دوزها متغیر است. IC_{50} که در این مطالعه به دست آمده (IC_{50} کلاله ۵/۲ mg/ml) به مقدار LC_{50} به دست آمده از مطالعه‌ای که بر روی Hela cell انجام شده (۲/۳ mg/ml) نزدیک‌تر است که هر دو بر روی عصاره اتانولی کلاله بررسی شده‌اند.

احتمال می‌رود محدوده دوزهای موثر به دست آمده به نوع سلول‌هایی که روی آن مطالعه می‌شود، بستگی داشته باشد و نتایج به دست آمده از این مطالعه حاکی از توافق و ارتباط بین سنجش دیسک سیب‌زمینی و مطالعه ذکر شده روی Hela cell است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره‌های الکلی کلاله و گلبرگ دارای اثر ضدتومور به روش برون‌تنی می‌باشند و توانایی کلاله در مهار رشد توموری نسبت به گلبرگ بیشتر می‌باشد. همچنین این تحقیق نشان داد که کلاله دارای سمیت کمتری نسبت به گلبرگ است.

منابع

1. Abdullaev FI, Rivera Luna R, Roitenburd Belacortu V and Espinosa Aguirre J. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Arch. Med. Res*. 2000; 31: 526–531.

2. Nair SC, Kurumboor SK and Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. *Cancer Biother*. 1995; 10: 257-264.

3. Ríos JL, Recio MC, Giner RM and Máñez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother. Res*. 1996; 10: 189-193.

4. Hosseinzadeh H and Khosravan V. Anticonvulsant effects aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Arch. Irn. Med*. 2002; 5: 44-7.

5. Hosseinzadeh H and Younesi H. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol*. 2002; 2.

6. Karimi G, Hosseinzadeh H and Khaleghpanah P. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice. *Irn. J. Basic Med. Sci*. 2001; 4: 11-15.

7. Nair SC, Pannikar B and Pannikar KR. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett*. 1991; 57: 109–114.

8. Abdullaev FI and Frenkel GD. Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis. *Bio. Factors* 1992; 3: 201–4.

9. Plission M, Morjani H, Manifait M and Tarantilis PA. Inhibition of prmyelocytic leukemia (HL-60) by caratenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Res*. 1994; 14:, 1913-8.

10. Brain KR and Turner TD. *The Practical Evaluation of Phytopharmaceuticals*. Wright-Scientechnica. Bristol. 1975, p: 153.

11. Chhabra SC, Uiso FC and Mshiu EN. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants. Part 1. *J. Ethnopharmacol*. 1984; 11: 157–179.

12. Mclaughlim JL. Crown gall tumors on potato discs and *Brine Shrimp* Lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In Dey PM, Hartorne JB. *Methods in Plant Biochemistry*. 1992; PP. 1-31.

13. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M and Fernandoz JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cell in vitro. *Cancer Lett*. 1996; 100: 23-30.

Archive of SID

www.SID.ir