ارزیابی مقایسه‌ای آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی گلبرگ سه گونهٔ زعفران

شیرین کردی و منصور افشارمحمدیان*

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۰۲/ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۸ / پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۴ / انتشار: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
*مسئول مکاتبات: afshar@guilan.ac.ir

چکیده. امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی از قبیل زعفران و ترکیبات آروماتیک آنها به‌مثابهٔ منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، به‌صورت روز افزون مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر کلاله زعفران، گلبرگ زعفران نیز یک منبع گیاهی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است. تحقیق حاضر در قالب آزمایشی با طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، به بررسی برخی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی گلبرگ‌های دو گونهٔ زعفران وحشی استان گیلان و مقایسهٔ آن با آنتی‌اکسیدان‌های زعفران زراعی (*C. sativus*) پرداخته است. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فنل کل، فلاونویید و آنتوسیانین در گونهٔ زعفران زراعی به‌صورت معنی‌داری بیشتر از دو گونهٔ دیگر است. میزان فلاونل در گونهٔ زعفران زیبا (*C. speciosus*) و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) در گونهٔ زعفران خزری (*C. caspius*) به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گونه‌های دیگر بود. میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گونه‌های زعفران زراعی و زعفران زیبا نیز به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گونهٔ زعفران خزری بود، ولی در مورد میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز اختلاف معنی‌داری بین سه گونهٔ بررسی شده مشاهده نشد. بنابراین، با توجه به نتایج این تحقیق، گلبرگ گونه‌های مختلف زعفران منبع خوبی از نظر دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی محسوب می‌شوند و می‌تواند مثل یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی در دسترس، در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی. پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنل، فلاونویید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Comparative evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants of petal of three species of saffron

Shirin Kordi & Mansour Afshar Mohammadian*

Received 23.06.2017/ Revised 09.09.2018/ Accepted 26.09.2018/ Published 19.03.2019

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
*Correspondent author: afshar@guilan.ac.ir

Abstract. Nowadays, the use of a wide range of medicinal herbs such as saffron and its aromatic compounds is increasingly being regarded as natural sources of antioxidant properties. In addition to saffron stigma, saffron petal is a rich herbal source of antioxidant compounds. The present study was conducted in a completely randomized design with three replications to study some of the enzymatic and non-enzymatic antioxidants of two species of wild saffron in Guilan Province compared with agronomic saffron (*C. sativus*). The results of this study showed that total phenol, flavonoids and anthocyanins in agronomic saffron were significantly higher than those in the other two species. The amount of flavonel in *C. speciosus* and the level of antioxidant activity (DPPH) in *C. caspius* were significantly higher than other species. The level of PPO activity in *C. sativus* and *C. speciosus* was significantly higher than that in *C. caspius*. However, there was no significant difference in the level of POD activity among the three studied species. Therefore, according to the results of this study, petals of different species of saffron are good sources of non-enzymatic and enzymatic antioxidants and can be used as an available natural antioxidant in the food and pharmaceutical industries.

Keywords. DPPH, flavonoid, phenol, POD, PPO

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus*) گیاهی چندساله، متعلق به تیرهٔ Iridaceae است. دو گونهٔ آن که به‌صورت خودرو در استان گیلان می‌رویند، کم‌وبیش تحت بررسی علمی قرار گرفته‌اند که شامل: گونهٔ زعفران خزری (*Crocus caspius* Fisch. & C.A.Mey. ex Hohen) و زعفران زیبا (*Crocus speciosus* M.Bieb.) هستند. ایران با بیش از ۹۵ درصد تولید زعفران در دنیا، بزرگترین تولید کننده زعفران در جهان محسوب می‌شود (Ghaeidamini *et al*., 2011). در فرایند تولید زعفران از قسمت کلاله و خامهٔ گل به عنوان زعفران تجارتی استفاده می‌شود و سایر قسمت‌های گل ازجمله گلبرگ‌ها که میزان بسیار قابل توجهی را نیز تشکیل می دهد، به‌عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود (Kaveh, 2016). بنابراین، یافتن راه‌حلی برای استفاده بهینه این حجم عظیم ضایعات گل زعفران از اهمیت بالایی برخوردار است.

تحقیقات بسیاری در حوزه بیولوژی و پزشکی به رادیکال‌هایی نظیر ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) اختصاص دارد. ROS در بسیاری از موجودات زنده برای فرایندهای متابولیکی طبیعی سلول مثل فاگوسیتوز، کاهش التهاب، سنتز کلاژن و تقسیم سلولی ضروری است (Poli & Parola, 1997). با این وجود، درحال‌حاضر شواهد درخورتوجهی وجود دارد که ROS به صدمات اکسیداتیو در بیومولکول‌ها (به‌خصوص در پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA) منجر می‌شود. این صدمات باعث اختلالات مختلف بالینی نظیر بیماری‌های قلبی-عروقی، پیری و آسیب‌های عصبی نظیر آلزایمر، پارکینسون، جهش‌های ژنتیکی و سرطان می‌شوند (Finkel & Holbrook, 2000).

موجودات زنده شبکهٔ آنتی‌اکسیدان پیچیده‌ای را برای خنثی-کردن گونه‌های فعال اکسیژن که برای زندگی انسان مضر هستند، به وجود آورده‌اند (Yu *et al*., 2004). سیستم‌های متعددی که وابسته به فعالیت آنزیم‌ها هستند، رادیکال‌های آزاد را سم‌زدایی می‌کنند؛ مثلاً سوپراکسید دیسموتاز حاوی مس و روی، تبدیل آنیون سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌کند و به دنبال آن آنزیم‌هایی مثل کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را با تبدیل‌کردن به آب و اکسیژن از محیط خارج می-کنند. علاوه‌براین، برخی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در مواد غذایی می‌توانند مانعی در برابر صدمات رادیکال‌های آزاد ازطریق جلوگیری از تشکیل رادیکال‌ها، جذب رادیکال‌های آزاد یا تسریع در از بین بردن آنها باشند (Abdollahi *et al*., 2005).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور مؤثر و به روش‌های مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد به شکل‌های اکسیژن و نیتروژن فعال با بیومولکول‌هایی نظیر پروتئین، آمینواسید، لیپید و DNA، جلوگیری کرده و سبب کاهش آسیب و یا مرگ سلولی وپیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع سرطان می‌شوند (Sharififar *et al*., 2007). در کنار نقش آنها در سامانه‌های زیستی، در مواد غذایی سرشار از چربی‌های غیراشباع نیز از کاهش کیفیت تغذیه‌ای، ایمنی، بدطعمی و بی‌رنگ‌شدن به‌علت ایجاد ترکیبات سمی جلوگیری می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها به دو دستهٔ شیمیایی و طبیعی تقسیم می‌شوند (Singh *et al*., 2010). آنتی-اکسیدان‌های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنعت غذا دارند، شامل بوتیلید هیدروکسی آنیزول، بوتیلید هیدروکسی تولوئن، ترسیوبوتیل هیدروکینون و پروپیل گالات بوده که سرطان‌زایی و اثرات منفی این ترکیبات بر سلامت انسان مشخص شده است (Kahl & Kappus, 1993). بنابراین، امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی و ترکیبات آروماتیک آنها به‌منزلهٔ منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مورد توجه محققین قرار گرفته است (Kulisic *et al*., 2004).

گیاه زعفران (*Crocus sativus*) که از کلاله گل آن، گران بهاترین ادویه جهان به‌دست می‌آید(Kafi *et al*., 2006)، دارای گل‌هایی است که گلبرگ‌های آن پس‌از جداکردن کلاله، به-عنوان ضایعات دور ریخته می‌شوند. گلبرگ زعفران به‌طور متوسط بیش از ۹۰ درصد وزن خشک گل را تشکیل می‌دهد (Kaveh, 2016). با توجه به بالابودن میزان تولید سالانهٔ زعفران در ایران، حجم بالایی از این مادهٔ ارزشمند، پس‌از جداکردن کلاله، بدون استفاده در طبیعت رها می‌شود. گلبرگ زعفران حاوی رنگدانهٔ آنتوسیانین، ترکیبات فلاونوئیدی دیگر و مشتقات گلیکوزیدی آنها است. براساس پژوهش‌های انجام شده بر گلبرگ زعفران، خواص درمانی فراوانی از جمله کاهش‌دهندهٔ فشار خون (Fatehi *et al*., 2003)، تسکین‌دهنده (Kubo & Kinst-Hori, 1999; Hosseinzadeh & Yonesi, 2002)، خاصیت ضدافسردگی (Akhondzadeh *et al*., 2007، Hadizadeh *et al*., 2003, Moshiri *et al*., 2006) و

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

کاهش‌دهندهٔ علائم قبل از قائدگی زنان (Agha-Hoseini *et al.*, 2008) برای آن معرفی شده است. این پژوهشگران خواص درمانی گوناگون گلبرگ زعفران را مربوط به حضور ترکیب‌های فلاوونوئیدی ازجمله آنتوسیانین‌ها و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آنها دانسته‌اند. از آنجایی که در ایران از گلبرگ‌های زعفران استفاده محدودی می‌شود و تحقیقات منتشر شده‌ای نیز در این مورد انجام نشده بود، به‌همین‌منظور، تحقیق حاضر در ارتباط با بررسی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی گلبرگ‌های گونه‌های زعفران وحشی استان گیلان و مقایسهٔ آن با آنتی‌اکسیدان‌های زعفران زراعی (*Crocus sativus*)، جهت ارزیابی اهمیت استفادهٔ غذایی و دارویی از گلبرگ‌های گونه‌های مختلف زعفران انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

گلبرگ‌های گونهٔ زعفران زیبا (*C. speciosus*) تحت مطالعه از ارتفاعات حدود ۸۰۰ متری رستم‌آباد ، زعفران خزری (*C. caspius*) از ارتفاعات حدود ۱۱۰ متری امامزاده هاشم به رستم‌آباد و گونهٔ زعفران زراعی(*C. sativus*) از مزرعه‌ای واقع در روستای نفوت در سه کیلومتری شهرستان صومعه‌سرا جمع‌آوری شدند. سپس گلبرگ‌ها را از بقیه اجزای گل جدا کرده و نیمی از نمونه‌ها به مخزن حاوی نیتروژن مایع انتقال داده شدند و پس از بسته‌بندی و نامگذاری، در فریزر ۷۰- درجهٔ نگه‌داری شدند و نیمی دیگر در آون با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

استخراج و سنجش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی

روش استخراج عصاره

۰/۵ گرم از نمونهٔ گلبرگ خشک شده، در هاون ساییده و به آن ۱۵۰۰ میکرولیتر حلال استخراج شامل متانل- استیک اسید (نسبت ۸۵ به ۱۵) اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۱۲۰۰g سانتریفیوژ شد. محلول روشناور جدا شده و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و به‌منظور سنجش محتوای فنل و فلاونل کل، از روش سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی DPPH Bakhshi & Arakawa (2006) استفاده شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای این منظور، به ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ ۱۰۰ برابر رقیق شده ۴۰۰۰ میکرولیتر محلول متانلی ۰/۰۰۴ درصد DPPH اضافه شد. کنترل و بلانک نیز به‌ترتیب با ۱ میلی‌لیتر محلول متانلی ۰/۰۰۴ درصد DPPH و ۱ میلی‌لیتر حلال استخراج آماده شد. سپس میکروتیوپ‌ها به خوبی تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظهٔ تاریک در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس جذب کنترل و نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد (Sarikurkcu *et al.*, 2008). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به‌صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه شد:

$$DPPHSc\% = (A_{cont} - A_{samp})/A_{cont} \times 100$$

%DPPHsc= درصد بازدارندگی، A_{cont} = میزان جذب DPPH، A_{samp}= میزان جذب (نمونه + DPPH)

سنجش فنل کل

به ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره، ۳۷۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰درصد و پس از ۶ دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد در تاریکی اضافه شد و پس از ۱/۵ ساعت قرارگرفتن در تاریکی و دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (Slinkard & Singleton, 1977). سپس با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید، میزان فنل کل برحسب میلی‌گرم اسیدگالیک در یک گرم وزن خشک بیان شد.

سنجش فلاونل کل

برای این منظور به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، ۲ میلی‌لیتر کلریدآلومینیم ۲ درصد، شش میلی‌لیتر استات سدیم ۵ درصد و ۱ میلی‌لیتر حلال استخراج اضافه شد. بلانک نیز به همین ترتیب با ۱ میلی‌لیتر حلال استخراج به جای عصاره آماده شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها پس از دو و نیم ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق در طول موج ۴۴۵ نانومتر خوانده شد (Venskutonis *et al.*, 2004). برای رسم نمودار استاندارد از روتین به عنوان مولکول استاندارد ااستفاده شد. با قرار دادن جذب هر کدام از نمونه‌ها در معادلهٔ منحنی استاندارد، غلظت هر نمونه بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به‌دست آمد.

سنجش آنتوسیانین کل

برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۵ گرم از برگ منجمدشدهٔ گیاه در ۳ میلی‌لیتر متانل‌اسیدی (شامل متانل و اسیدکلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱)، خوب ساییده و سپس عصارهٔ حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

۱۶۱۳۰g سانتریفیوژ شد. محلول رویی پس از صاف شدن به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد و شدت جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبهٔ غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی $cm^{-1}M^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد و نتایج بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر بیان شد (Masukasu *et al.*, 2003).

سنجش فلاونوئید کل

برای سنجش فلاونویید، ۰/۱ گرم تودهٔ سلولی منجمدشده در سه میلی‌لیتر اتانل‌اسیدی (اتانل و اسیداستیک به نسبت ۹۹ به ۱)، خوب ساییده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۱۳۰gسانتریفیوژ شد. پس از صاف کردن، محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن، در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبهٔ غلظت فلاونوئید، از ضریب خاموشی $cm^{-1}M^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد (Krizek *et al.*, 1993).

استخراج عصارهٔ آنزیم‌ها

گلبرگ های فریزشده را در هاون چینی با نیتروژن مایع کوبیده تا کاملاً خرد شوند. مقدار ۰/۵ گرم از پودر برگ آسیاب شده را با افزودن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، نخست ورتکس شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۱۹۵۰g در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. سپس عصارهٔ رویی دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۱۹۵۰g در دمای ۴ درجهٔ سانتی گراد، سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، عصارهٔ رویی برای سنجش آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و پروتئین استفاده شد (Beauchamp & Fridovich, 1971).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD)

بافر فسفات به مقدار ۱۲۰۰ میکرولیتر، H_2O_2 به مقدار ۵۰ میکرولیتر و ۲۲/۳ میلی‌گرم گایاکول در دمای پایین (ظرف حاوی یخ) با هم مخلوط شد و به آن ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی اضافه و میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در محلول بلانک به جای عصارهٔ آنزیمی، ۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7) استفاده شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی معادل $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲۶/۶ محاسبه شد و فعالیت آنزیم در نهایت با استفاده از فرمول ($A_{470}/26.6\times1000/50/0.1$) بر حسب $\mu mol\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$ محاسبه شد (Bergmeyer, 1974).

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) **

در این روش ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ mM با pH ۷/۲ ، ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالول (۰/۰۲ M) و حجم معینی از عصارهٔ آنزیمی که در طول موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد، در نهایت میزان فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۰/۰۰۱ بر حسب واحد آنزیمی در ۱ گرم بافت تازه با قرار دادن در فرمول ($A_{430}/0.001*1000/50/0.1$) محاسبه شد (Gregory & Bendali, 1966).

سنجش پروتئین کل

اندازه‌گیری میزان پروتئین کل با استفاده از عصارهٔ تهیه شده در بخش آنزیمی (نمونه تر گیاهی) و معرف رنگی کوماسی برلیانت بلو G-250 در اتانل ۹۵ درصد و ارتوفسفریک اسید ۸۵ درصد انجام شد (Bradford, 1976). از پروتئین گاما گلوبولین پلاسمای گاوی (BSA)، به‌عنوان پروتئین استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. بدین منظور سوپرناتانت آنزیمی استخراج شده، به ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد اضافه و محتویات لوله‌ها پس از مخلوط‌شدن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت تام پروتئینی بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده، محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکدهٔ علوم دانشگاه گیلان اجرا شد. تجزیهٔ آماری به کمک نرم‌افزار SPSS ver.21 انجام شد. تحلیل واریانس با استفاده از روش ANOVA یک‌طرفه انجام شد. آزمون Tukey برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. انحراف از میانگین داده‌ها را به وسیله خطای استاندارد نشان داده و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excell 2010 استفاده شد.

نتایج

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

همان طور که در شکل ۱ مشخص شده است، درصد بازدارندگی DPPH در گلبرگ گونهٔ خزری (*C. caspius*) ۶/۰۹ ± ۷۵/۷۵ $\mu g\ ml^{-1}$ ، در گونهٔ زیبا (*C. speciosus*) ۰/۹ ± ۴۳/۴۷ µg

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

ml^{-1} و در گونهٔ زراعی(*C. sativus*) ۲/۹۵ ± ۴۷/۴۳ $\mu g\ ml^{-1}$ به‌دست آمد (شکل ۱). درصد بازدارندگی DPPH در گلبرگ *C. caspius* از دو گونهٔ دیگر به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود.

محتوای فلاونل کل

براساس نتایج حاصل از این تحقیق، میزان فلاونل کل در گلبرگ گونهٔ زعفران خزری (*C. caspius*) ۶/۶۸ ± ۲۲۶/۴۱ $mg\ g^{01}$ DW در گونهٔ زعفران زیبا (*C. speciosus*) ۸۳/۸۵±۴۳۲/۳۱ $mg\ g^{01}$ DW و در گونهٔ زعفران زراعی (*C. sativus*) ۱۰/۴۴۷۵ ± ۲۶۴/ $mg\ g^{01}$ DW به‌دست آمد (شکل ۳). میزان فلاونل کل در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* نسبت به دو گونهٔ دیگر به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود.

محتوای آنتوسیانین

براساس نتایج تحقیق حاضر، میزان آنتوسیانین در گلبرگ گونهٔ *C. caspius* 04/0 ± ۰/۰۵ mg/gFW، در گونهٔ *C. speciosus* 01/0± ۰/۱۵ mg/gFW به دست آمد. میزان آنتوسیانین در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* به‌طور معنی‌داری بسیار بیشتر از گونهٔ *C. caspius* بود. میزان آنتوسیانین در گونهٔ زعفران زراعی (*C. sativus*) ارزیابی نشد (شکل ۴).

محتوای فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید در گلبرگ گونهٔ خزری (*C. caspius*)، ۰/۱۳ ± ۰/۳۵ mg/gFW، در گونهٔ زیبا (*C. speciosus*)، ۱/۸۰ ± ۳/۵۷ mg/gFW به‌دست آمد. محتوای فلاونوئید در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* به‌طور معنی‌داری بسیار بیشتر از گونهٔ *C. caspius* بود و نتایج آن در شکل ۵ نشان داده شده است. میزان فلاونوئید در گونهٔ زعفران زراعی (*C. sativus*) ارزیابی نشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD)

با توجه به شکل ۶، در گلبرگ گونهٔ خزری (*C. caspius*)، ۱/۱۸ ± ۷/۵۸ $mM\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$، در گونهٔ زیبا (*C. speciosus*)، ۱/۳۶ ± ۴/۵۱ $mM\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$ و در گونهٔ زراعی *C. sativus*، ۱/۵۵ ± ۶/۷۹ $mM\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$ بود. محتوای آنزیم POD در گلبرگ سه گونه بررسی شده با هم اختلاف معنی‌داری نداشت. در این زمینه پژوهشی صورت نگرفته بود که از داده‌های آن جهت مقایسه استفاده شود.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO)

با توجه به شکل ۷، در گلبرگ گونهٔ خزری (*C. caspius*)، ۱/۰۷ ± ۹/۷۴ $mM\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$، در گونهٔ زیبا (*C. speciosus*)، ۲/۳۰ ± ۳۰/۶۳ mM/g F.W. min و در گونهٔ زراعی (*C. sativus*)، ۴/۴۳ ± ۲۱/۰۹ $mM\ g^{-1}\ FW\ min^{-1}$، بود. فعالیت آنزیم PPO در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* به‌صورت معنی‌داری از گلبرگ گونهٔ *C.sativus* و در گلبرگ گونهٔ *C. sativus* به‌صورت معنی‌داری از گلبرگ گونهٔ *C. caspius* بیشتر بود.

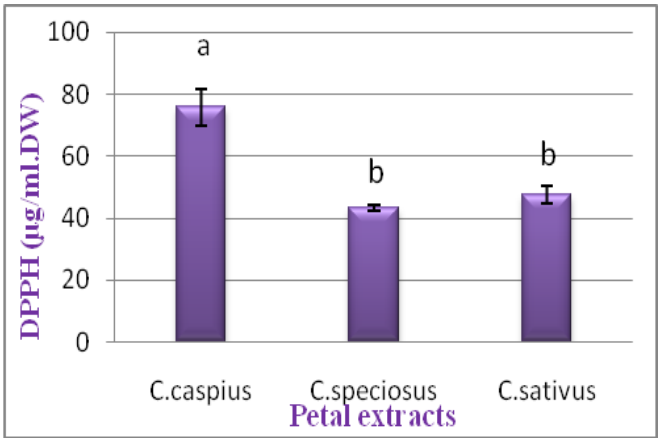
محتوای پروتئین کل

همان‌طور که در شکل ۸ مشخص شده است، میزان پروتئین کل در گلبرگ گونهٔ خزری (*C. caspius*)، ۰/۰۳ ± ۴/۱۱ µg/g، در گونهٔ زیبا (*C. speciosus*)، ۰/۰۵ ± ۳/۷۸ µg/g و در گونهٔ زراعی *C. sativus*، ۰/۰۹ ± ۴/۰۰ µg/g بود. محتوای پروتئین کل در گلبرگ سه گونهٔ بررسی شده با هم اختلاف معنی‌داری نداشت.

بحث

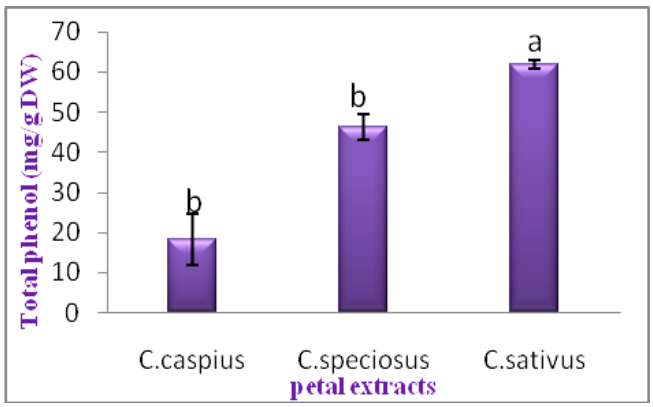
نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که درصد بازدارندگی DPPH در گلبرگ گونهٔ *C. caspius* از دو گونهٔ دیگر (*C. sativus* و *C. speciosus*) به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۱). نتایج ارزیابی Goli و همکاران (2015) در مورد درصد بازدارندگی DPPH گلبرگ زعفران گونهٔ زراعی *C. sativus*، ۲/۸۹ ± ۳۹/۸۰ µg/ml، بدست آمد. این نتایج تقریبا مشابه میزان به‌دست‌آمده برای گلبرگ گونهٔ *C. sativus* و *C. speciosus* در این تحقیق است و مقدار آن کمتر از مقدار گونهٔ *C. caspius* بررسی‌شده در این تحقیق است. یافته‌های تحقیقات Afraze و همکاران (2014)، روی عصاره‌های گلبرگ زعفران نشان‌دهندهٔ وجود ارتباط مستقیم اجزای فنولیک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود و با افزایش غلظت ترکیبات فنولیک، میزان درصد مهارکنندگی نیز افزایش یافت. تناقض در نتایج به‌دست‌آمده در تحقیقات مختلف می تواند در ارتباط با تنوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیزم مختلف واکنش آنها و سینتیک متفاوت واکنش‌های مهاری آنها در روش‌های انتخابی باشد. اساسا ظرفیت آنتی-اکسیدانی اندازه‌گیری شده یک نمونه با روش مورد استفاده و منبع تولید رادیکال آزاد یا عامل اکسید کننده در ارتباط است. در تحقیق حاضر با توجه به شکل ۲، میزان فنل کل در گلبرگ گونهٔ

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]



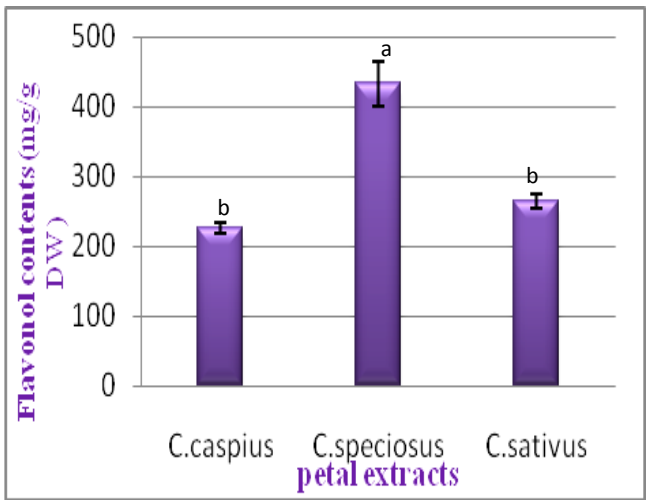
شکل ۱- درصد بازدارندگی DPPH در گلبرگ سه گونهٔ مختلف زعفران. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است ($P \leq 0.05$).

Fig. 1. The DPPH contents of crocus petals of three different species. Data shown as mean ± S.E. ($P \leq 0.05$).



شکل ۲- میزان فنل کل در گلبرگ سه گونهٔ مختلف زعفران. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است ($P \leq 0.05$).

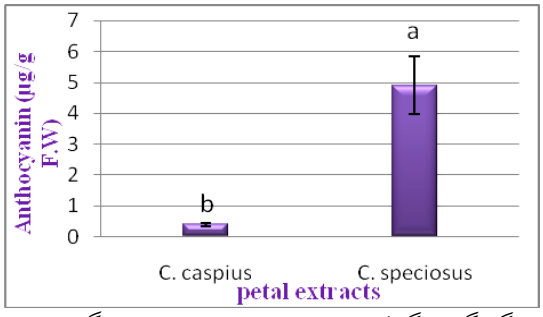
Fig. 2. The total phenol contents of crocus petals of three different species. Data shown as mean ± S.E. ($P \leq 0.05$).



شکل ۳- میزان فلاونل در گلبرگ سه گونهٔ مختلف زعفران. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است ($P \leq 0.05$).

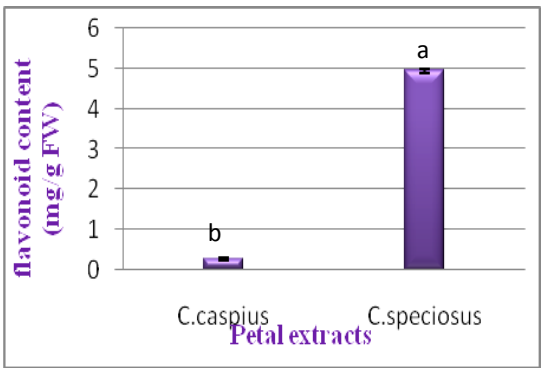
Fig. 3. The flavonol contents of crocus petals of three different species. Data shown as mean ± S.E. ($P \leq 0.05$).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]



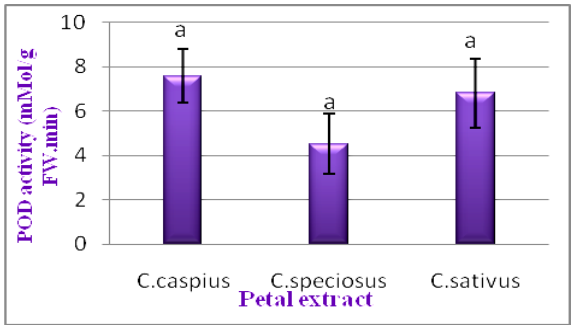
شکل ٤- میزان آنتوسیانین در گلبرگ دو گونهٔ مختلف زعفران. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است (P≤0.05).

Fig. 4. The anthocyanin contents of crocus petals of two different species. Data shown as mean ± S.E. (P≤0.05).



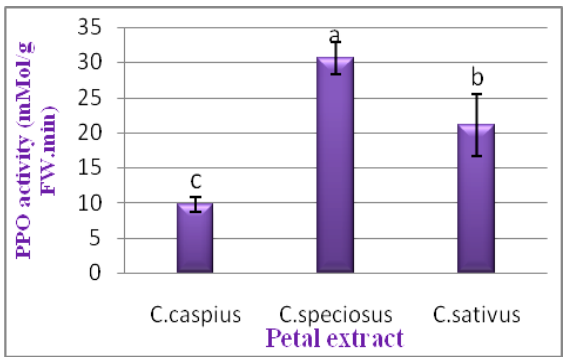
شکل ٥- میزان فلاونوئید در گلبرگ دو گونهٔ مختلف زعفران در طول موج ۳۳۰. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است (P≤0.05).

Fig. 5. The flavonoid content of crocus petals of two different species. Data shown as mean ± S.E. (P≤0.05).



شکل ٦- فعالیت آنزیم POD در گلبرگ سه گونهٔ مختلف زعفران. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است (P≥0.05).

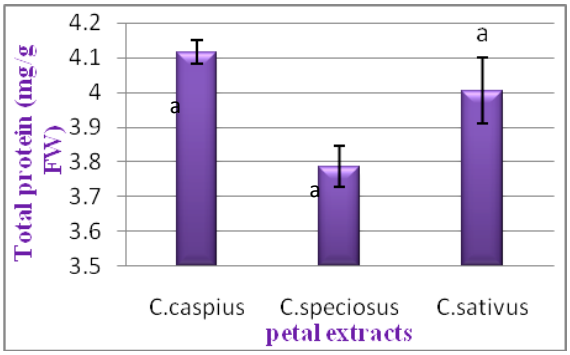
Fig. 6. POD enzymatic activity of crocus petals of three different species. Data shown as mean ± S.E. (P≥0.05).



شکل ٧- فعالیت آنزیم PPO در گلبرگ سه گونهٔ مختلف زعفران. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است (P≥0.05).

Fig. 7. PPO enzymatic activity of crocus petals of three different species. Data shown as mean ± S.E. (P≥0.05).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]



شکل ۸- میزان پروتئین کل در گلبرگ سه گونهٔ مختلف زعفران. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است($P\geq0.05$).

Fig. 8. The total protein contents of crocus petals of three different species. Data shown as mean ± S.E. ($P\geq0.05$).

C. sativus از دو گونهٔ (*C.caspius* و *C. speciosus*) به صورت معنی‌داری بیشتر بود. تحقیقات Sariri و همکاران (2011) نشان داد که محتویات فنل کل عصارهٔ متانلی گلبرگ زعفران ۰/۴۵ ± ۸۶/۶۵ میلی گرم بر گرم گالیک اسید بود که تقریبا مشابه میزان بدست آمده برای گونهٔ *C. sativus* در تحقیق حاضر و مقدار آن بسیار بیشتر از مقدار دو گونهٔ دیگر بررسی شده در این تحقیق بود. Delgrado و همکاران (2006) بیان کردند که رشد گیاه و سنتز متابولیت های ثانویه تحت تاثیر شرایط مختلف جغرافیایی، عوامل ژنتیکی و درجهٔ حرارت تنظیم می شود. تحقیقات Afraze و همکاران (2014)، بر روی عصاره های گلبرگ زعفران نشان داد در هر دو حلال اتانل و متانل با افزایش درصد حلال ها (کاهش میزان آب) میزان ترکیبات فنلی آنها نیز کاهش می یابد. عصاره های اتانلی نسبت به عصاره های متانلی در غلظت یکسان میزان ترکیبات فنلی بیشتری داشتند.

بر اساس شکل های ۵-۳ میزان فلاونل کل در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* نسبت به دو گونهٔ دیگر به صورت معنی داری بیشتر بود. میزان آنتوسیانین و محتوای فلاونوئید در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* به طور معنی داری بسیار بیشتر از گونهٔ *C. caspius* بود. در تحقیقات قبلی میزان آنتوسیانین منومری کل موجود در نمونه گلبرگ گونهٔ *C. sativus* برابر ۱۷۱۲/۱۹ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده و متغیر های این فرایند شامل دما، زمان، نسبت حلال و درصد اتانل به لحاظ آماری دارای اثر مستقل معنی دار بر استخراج آنتوسیانین گلبرگ زعفران ذکر شده بودند (Mahdavee Khazaei *et al.*, 2014). پژوهشگران اخیر خواص درمانی گوناگون گلبرگ زعفران را مربوط به حضور ترکیبات فلاونوئیدی از جمله آنتوسیانین ها و ویژگی های آنتی اکسیدانی آنها دانسته اند. بر اساس بررسی های انجام شده بر گل ۷۰ گونهٔ و ۴۳ زیر گونهٔ گیاه زعفران، آنتوسیانین های اصلی موجود در گلبرگ شامل ۳ و ۵ دی بتا گلیکوزید دلفینیدین (بیش از ۳۰ درصد از کل آنتوسیانین موجود)، ۳ بتاروتینوزید دلفینیدین و ۳ و ۵ دی بتا گلیکوزید پتونیدین (هر یک به میزان بیش از ۱۰ درصد کل آنتوسیانین موجود (انواع دیگر دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین) هر یک به مقادیر کمتر از ۱۰ درصد)، شناسایی کردند (Norbark *et al.*, 2002). دیگر بررسی های صورت گرفته بر روی ترکیبات فلاونوئیدی گلبرگ زعفران، غالب بودن آنتوسیانین نوع دلفینیدین را تأیید کرده است (Williams *et al.*, 1986; Garido *et al.*, 1987). همچنین Montoro و همکاران (2008)، محتوای فلاونوئید در گلبرگ *C. sativus* را ۶/۲۷±۰/۶ mg/g گزارش کردند که بسیار بیشتر از مقدار بدست آمده در دو گونهٔ خودرو در استان گیلان که در این تحقیق تحت بررسی قرار گرفت، مطالعات فیتوشیمیایی Anjum و همکاران (2015) نشان داد که حضور فلاونوئیدهایی مانند روتین، کوئرستین، لوتئولین، هسپریدین، بیوفلاونوئیدها، تانن ها و آنتوسیانین های گلبرگ گل ها می توانند اثرات ضد درد و ضد التهاب و کاهندهٔ فشار خون داشته باشند. تجزیه و تحلیل محتوای فنل و فلاونوئید عصارهٔ کلاله زعفران (آب جوش، الکلی و متانلی) توسط Karimi و همکاران (2010) نشان داد که حلال های متفاوت، مقادیر مختلفی از فنل کل و فلاونوئیدها را در زعفران نشان می دهند و محتوای فنل و فلاونوئید به مقدار قابل توجهی در عصارهٔ متانلی بالاتر بود. تحقیقات Afraze و همکاران

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

(2014) نشان داد اختلاف در میزان راندمان استخراج عصاره ها در پژوهش های قبلی و پژوهش حاضر احتمالا به علت تفاوت در شرایط کشت، منطقهٔ جغرافیایی و زمان برداشت نمونه و همچنین شرایط استخراج عصاره به روش حلال سرد با استفاده از حلال متانل، اتانل و آب است که شامل: زمان استخراج، سرعت اختلاط و اندازه ذرات پودر گلبرگ زعفران است.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، محتوای آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD) در گلبرگ سه گونه بررسی‌شده با هم اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین محتوای آنزیم پلی فنل‌اکسیداز (PPO) در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* به‌صورت معنی‌داری از گلبرگ گونهٔ *C. sativus* و در گلبرگ گونهٔ *C. sativus* به‌صورت معنی‌داری از گلبرگ گونهٔ *C. caspius* بیشتر بود (شکل های ۶ و ۷). گاهی رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در شرایط تنش به وجود می‌آیند، با حمله به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو باعث مهار این آنزیم‌ها می‌شوند. این ROSها می‌توانند منجر به آسیب اکسیداتیو اسیدهای چرب در غشای سلولی و شکستگی زنجیره‌های DNA شوند. این آنزیم‌های آنتی اکسیدانی یک مکانیسم دفاعی در گیاه هستند. وقتی به گیاه خسارت وارد می‌شود، فرایند آنتی‌اکسیدانی و مکانیسم سمیت‌زدایی در برابر تولید ROS رخ می‌دهد. بعلاوه برای ازبین‌بردن هیدروژن پراکسید فعالیت‌های PPO و POD افزایش می‌یابد. جمع‌آوری رادیکال‌ها توسط آنزیم‌هایی مانند POD، یکی از مکانیسم‌های مهم مقاومت در برابر تنش است (Gill & Tuteja, 2010). Vuleta و Tucic (2009) گزارش کردند که فعالیت POD با افزایش دما افزایش می‌یابد و در گیاهان در حال رشد تحت نور کامل خورشید بیشتر از گیاهانی است که در معرض سایه قرار دارند. انرژی فعال سازیPOD بالاتر از SOD یا CAT بوده که در نور خورشید پایین تر از گیاهانی است که در معرض سایه قرار دارند. به عقیده برخی محققان افزایش فعالیت پراکسیدازهای بازی ناشی از برداشته شدن اثر مواد خاصی است که به مواد پوشاننده معروف هستند و کاهش سریع آنان باعث افزایش فعالیت پراکسیدازهای بازی می‌شود. ازجمله این مواد می‌توان ترکیبات فنلی را نام برد. پلی فنل اکسیداز به طور غیرمستقیم قادر به تنظیم ساخت ترکیبات فنلی است که در اندام زایی و به ویژه ریشه زایی نقش دارند. نقش پلی فنل اکسیداز در ریشه زایی همراه و همگام با پراکسیداز عمل می کند. بنابراین می توان گفت که افزایش سطح پلی فنل 467اکسیداز سبب کاهش ترکیبات فنلی شده و کاهش این ترکیبات از طریق کاهش غلظت اکسین سبب افزایش فعالیت پراکسیدازها و القای رشد می شود. همچنین افزایش پراکسیداز یکی از شاخص‌های تغییر حالت مرفوژنز گیاه است. نقش پراکسیدازها و ارتباط آن با ترازاکسین، در تنظیم ریخت‌زایی گیاهی موردتوجه بسیار قرارگرفته است. پراکسیداز ممکن است به خاطر مشارکت در حفظ ثبات درونی اکسین، از طریق کاتابولیسم آن در فرایند تشکیل گل نقش داشته باشد. جوانه انتهایی زعفران زراعی، بنیان گذاری و تمایز اندام‌های گل با افزایش در فعالیت پراکسیدازی و اکسین اکسیدازی همراه است (Nasirian *et al*., 2014).

با توجه به شکل ۸، محتوای پروتئین کل در گلبرگ سه گونه بررسی شده با هم اختلاف معنی‌داری نداشت. محتوای پروتئین کل موجود در گلبرگ گونهٔ *C. sativus* در تحقیقات قبلی ۰/۰۹ ± ۸/۷۳ mg/g گزارش شده بود (Mahdavee khazaei *et al*., 2014) که بیشتر از میزان به‌دست آمده در تحقیق حاضر است. این تفاوت می تواند به علت تفاوت در شرایط آب و هوایی محل رشد و نمو نمونه های بررسی شده باشد. کاهش در محتوای پروتئینی در غلظت‌های بالای یون می‌تواند بعلت کاهش در سنتز بعضی پروتئین ها یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک باشد. همچنین کاهش در محتوای پروتئین می‌تواند به اثر متفاوت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مربوط باشد، به گونه‌ای که ROS با صدمه زدن به پروتئوم سبب نابودی شماری زیادی از پروتئین شوند (Turkina, 2008).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فنل کل، فلاونویید و آنتوسیانین در گلبرگ گونهٔ *C.sativus* به‌صورت معنی‌داری بیشتر از دو گونهٔ *C. caspius* و *C. speciosus* بود. میزان فلاونل در گلبرگ گونهٔ *C. speciosus* و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) در گونهٔ *C. caspius* به‌صورت معنی‌داری بیشتر از دو گونهٔ دیگر بررسی شده بود. میزان فعالیت آنزیم PPO در گونه‌های *C. sativus* و *C. speciosus* نیز به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گونهٔ *C. caspius* بود، ولی در مورد میزان فعالیت آنزیم POD

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

اختلاف معنی‌داری بین سه گونهٔ بررسی شده مشاهده نشد. بنابراین، با توجه به نتایج این تحقیق، گلبرگ گونه‌های مختلف زعفران وحشی و زراعی منبع خوبی از نظر دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی محسوب می‌شود و می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی در دسترس، در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به دلیل حمایت مالی و مهندس فاطمه امیدی مسئول آزمایشگاه علوم گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان به سبب راهنمایی‌هایی ارزنده ایشان در طول انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌کنند.

REFERENCES

Abdollahi, M., Larijani, B., Rahimi, R. and Salari, P. 2005. Role of oxidative stress in osteoporosis. – Therapy 2: 787-796.

Afraze, Z., Bolandi, M., Khorshidi, M. and Mohammadi, N.A. 2014. Evaluation of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts (methanol, ethanol) saffron petals. – J. Saf. Agron. Technol. 2: 231-236.

Agha Hosseini, M., Kashani, L., Aleyaseen, A., Ghoreishi, A., Rahmanpour, H. and Zarrinara, A. 2008. *Crocus sativus* L. (saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo-controlled trial. – BJOG. 115: 515-519.

Akhondzadeh Basti, A., Moshiri, E., Noorbala, A.A., Jamshidi, A.H., Abbasi, SH. and Akhondzadeh, S. 2007. Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: a pilot double-blind randomized trial. Progress Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry. 31: 439-442.

Anjum, N., Pal, A. and Tripathi, Y.C. 2015. Phytochemistry and pharmacology of saffron, the most precious natural source of colour, flavour and medicine. – SMU. 2: 335-346.

Bakhshi, D. and Arakawa, O. 2006. Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. – J. Appl. Horticul. 8: 101-104.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. – Anal. Biochem. 44: 276-282.

Bergmeyer, H.U. 1974**.** Methods of Enzymatic Analysis 1, 2nd Edition, p: 495. – Academic Press, New York.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – Anal. Biochem. 72: 248-254.

Delgrado, M.C., Aramburu, A. and Dìaz-Marta, G.L.A. 2006. The Chemical Composition of Saffron: Color, Taste and Aroma, Editorial Bomarzo, Albacete.

Fatehi, M., Rashidabady, T. and Fatehi- Hassanabad, Z. 2003**.** Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. – J. Ethnopharmacol. 84: 199- 203.

Finkel, T. and Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. – Natur. J. 408: 239-247.

Garido, J., Diez de Bethencourt, C. and Revilla, E. 1987**.** Flavonoid composition of hydrolysed tepal extracts of *Crocus sativus* L. – Anal. Bromatol. 39: 69-77.

Ghaeidamini, M., Shahrokhi, A., Khodakarimi, A. 2011. The impact of climate change on flowering behavior of saffron. National Conference on Climate Change and its Impact on Agriculture and Environment, Uremia.

Gill, S. S. and Tuteja N. 2010**.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. – Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.6.0]

[DOI: 10.29252/nbr.5.4.438]

Gregory, R.P.F. and Bendali, D.S. 1966**.** The Purification and some Properties of the Polyphenol Oxidase from Tea (*Camellia sinensis* L.). – Biochem. J. 101: 569.

Hadizadeh, F., Khalili, N., Hosseinzadeh, H. and Khair-Aldine, R. 2003. Kaempferol from Saffron Petals. – IJPR. 2: 251-252.

Hosseinzadeh, H. and Younesi, H.M. 2002**.** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. – BMC Pharmacol. 2: 7-15.

Kafi, M., Hemmati-Kakhki, A. and Karbasi, A. 2006. Historical background, economy, acreage, production, yield and uses. pp: 1-11. **–** In: Kafi, M., Koocheki, A., Rashed, M.H., Nassiri, M. (eds.). Saffron (*Crocus sativus*) Production and Processing. – Sci. Publishers, Enfield.

Kahl, R. and Kappus, H. 1993**.** Toxicity of synthetic antioxidants BHT and BHA in comparison with natural antioxidants vitamin E. – Z .Lebensm.Unters. Forsch. 196: 329-38.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R. and Jaafar, H. Z. E. 2010**.** Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. – Molecules 15: 6244-6256.

Kaveh, H. 2016. Effect of saffron petal extract on retention quality of fresh-cut watermelon cubes. – Saffron Agro. Tech. 4: 301-311

Krizek, D.T., Kramer, G.F., Upadyaya, A. and Mirecki, R.M. 1993. UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. – Physiol. Plantarum 88: 350-358.

Kubo, I. and I. Kinst-Hori 1999**.** Flavonols from Saffron Flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. – J. Agri. Food Chem. 47: 4121-4125.

Kulisic, T., Radonic, A. and Katalinic, V. 2004. Use of different methods for testing antioxidative of oregano essntial oil. – Food Chem. 85: 40-633.

Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S.M., Ghorbani, M. and Hemmati Kakhki, A. 2014**.** Optimization of anthocyanin extraction in Saffron's petal with response surface methodology. – JRIFST. 3: 37-50.

Masukasu, H., Karin, O., and Kyoto, H. 2003**.** Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. – Plant Sci. 164: 259-265.

Montoro, P., Tuberosob, C.I., Maldini, M., Cabrasb, P. and Pizza, C. 2008**.** Qualitative profile and quantitative determination of flavonoids from *Crocus sativus* L. petals by LC-MS/MS. – NPC. 3: 893-900.

Moshiri, E., Basti, A.A., Noorbala, A.A., Jamshidi, A.H., Hesameddin Abbasi, S. and Akhondzadeh, S. 2006. *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mildto-moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. – Phytomedicine; 13: 607- 611.

Nasirian, F., Sorush Zadeh, A., Ghanati, F., Oraki, H. 2014**.** The effect of root-zone temperature on antioxidant activities in saffron corm. – J. Saf. Agron. Technol. 2: 145-154.

Norbark, R., Brandt, K., Nielsen, J. K., girgaard, M. and Jacobsen, N. 2002**.** Flower pigment composition of crocus species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. – Biochem. Syst. Ecol. 30: 763-791.

Poli, G. and Parola, M. 1997**.** Oxidative damage and fibrogenesis. – Free Radic. Biol. Med. 22: 287-305.

Sarikurkcu, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. and Harmandar, M. 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays. – Bioresour. Technol. 99: 4239-4246.

Sariri, R., Sabbaghzadeh, R. and Poumohamad, F. 2011**.** *In-Vitro* antioxidant and anti-tyrosinase activity of methanol extracts from *Crocus* Sativus flowers. – Pharmacol. 2: 1205-1215.

Sharififar, F., Moshafi, M.H. and Mansouri, S.H. 2007**.** In vitro evalution of antibacterial and antioxidant of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss. – Food Cont. 18: 5-800.

Singh, G., Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977**.** Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. – Am. J. Enol. Viticul. 28: 49-559.

Singh Gill, S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.

Turkina, M. 2008**.** Functional proteomics of protein phosphorylation in algal photosynthetic membranes, pp: 1-58. – Linköping, Sweden.

Venskutonis, P.R., Miliauskas, G. and van Beek, T.A. 2004**.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. – Food Chem. 85: 231-237.

Vuleta, A. and Tucic B. (2009) Thermal dependence of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in foliage of *Iris pumila* L. – Arch. Biol. Sci. 61: 441-446.

Yu, W., Zhao, Y. and Shu, B. 2004**.** The radical scavenging activities of radix pueraiae iso Flavonoids: Achemiluminescence study. – Food Chem. 86: 525-529.

Williams, C.A., Harborne, J.B. and Goldblatt, P. 1986. Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family iridaceae. – Phytochem. 25: 2135-2154.

*****

How to cite this article:

Kordi, SH. And Afshar Mohammadian, M. 2019. Comparative evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants of petal of three species of saffron. – Nova Biol. Reperta 5: 438-448.

کردی، ش. و افشارمحمدیان، م. ۱۳۹۷. ارزیابی مقایسه‌ای آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی گلبرگ سه گونهٔ زعفران. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۴۴۸-۴۳۸.