

FARKLI ÇÖZGEN VE ÇÖZGEN KARIŞIMLARI İLE EKSTRAKSİYONUN SAFRANIN (*Crocus sativus L.*) TOPLAM BİYOAKTİF BİLEŞEN MİKTARINA ETKİSİ

Saeid Chobdar Rahim*, Janan Hossein Zadeh, Fikret Pazır, Gülden Ova
Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir

Geliş / Received: 11.02.2021; Kabul / Accepted: 16.09.2021; Online baskı / Published online: 04.10.2021

Chobdar-Rahim, S., Hossein-Zadeh, J., Pazır, F., Ova, G. (2021). Farklı çözümler ve çözümler karışımları ile ekstraksiyonun safranın (*Crocus sativus L.*) toplam biyoaktif bileşen miktarına etkisi. *GIDA* (2021) 46 (5) 1289-1300 doi: 10.15237/gida.GD21031.

Chobdar-Rahim, S., Hossein-Zadeh, J., Pazır, F., Ova, G. (2021). Farklı çözümler ve çözümler karışımları ile ekstraksiyonun safranın (Crocus sativus L.) toplam biyoaktif bileşen miktarına etkisi. GIDA (2021) 46 (5) 1289-1300 doi: 10.15237/gida.GD21031.

ÖZ

Safran Standardına göre (TS/ISO 3632, 2011) kalite açısından birinci derece bir safran baharatının, 13 farklı çözümler sistemi (saf su, metanol, etanol, asetonun farklı oranlarda karışımı) kullanılarak elde edilen ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarıyla antioksidan aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek toplam fenolik madde miktarı 2265.00 mg GAE/100 g KM ile su/etanol/metanol (v/v/v, 30/30/40) ekstraktında saptanırken, en düşük toplam fenolik madde miktarı 40.00 mg GAE/100 g KM ile aseton ekstraktında saptanmıştır. Toplam flavonoid madde açısından en yüksek miktar 587.14 mg KE/100 g KM ile su/etanol/metanol (v/v/v, 30/30/40) ekstraktında tespit edilirken, aseton ekstraktında flavonoid bileşeni tespit edilememiştir. Antioksidan aktivite açısından DPPH ve ABTS+ analiz yöntemlerinde en yüksek değerler sırasıyla 1202.68 mg TE/100 g KM ve 1383.74 mg TE/100 g KM ile su/etanol/metanol (v/v/v, 30/30/40) ekstraktında saptanırken, en düşük miktar DPPH için 232.43 mg TE/100 g KM etanolde ve ABTS+ için 251.23 mg TE/100 g KM aseton ekstraktında saptanmıştır.

Anahtar kelimeler; Safran, ekstraksiyon, toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, antioksidan aktivite

THE EFFECT of EXTRACTION WITH DIFFERENT SOLVENTS and SOLVENT MIXTURES on THE TOTAL AMOUNT of BIOACTIVE COMPONENTS of SAFFRON (*Crocus sativus L.*)

ABSTRACT

This study examines various activities of the saffron, first quality according to Saffron Standard (TS/ISO 3632, 2011) extracts by using 13 different solvent systems, (distilled water, methanol, ethanol, acetone and their mixtures at different levels). Total phenolic measured in water, ethanol,

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: saeid.choobdar@hotmail.com

☎: (+90) 232 311 3018

☎: (+90) 232 342 7592

Saeid Chobdar Rahim; ORCID no: 0000-0002-5888-5441

Janan Hossein Zadeh; ORCID no: 0000-0002-1024-9980

Fikret Pazır; ORCID no: 0000-0003-3997-4892

Gülden Ova; ORCID no: 0000-0002-9161-0212

methanol, (v/v/v, 30/30/40) extract with 2265.00 mg GAE/100 g DM as highest and, the acetone extract with 40.00 mg GAE/100 g DM as lowest. The highest amount of total flavonoids was detected in water, ethanol, methanol (v/v/v, 30/30/40) extract with 587.14 mg CE/100 g DM, flavonoid component was not detected in acetone extract. As antioxidant activity in DPPH and ABTS⁺ analysis methods, the highest values were detected in water, ethanol, methanol (v/v/v, 30/30/40) extract with 1202.68 mg TE/100 g DM and 1383.74 mg TE/100 g DM, respectively. The lowest were detected 232.43 mg TE/100 g DM (DPPH) in ethanol and 251.23 mg TE/100 g DM (ABTS⁺) in acetone extract.

Keywords; saffron, extraction, total phenolic content, flavonoid content, antioxidant activity

GİRİŞ

Safran (*Crocus sativus* L.) yaygın adı zaferan olan süsengiller (*Iridaceae*) familyasından, sonbaharda çiçek açan 20–30 cm boyunda, çiğdem (*Crocus*) cinsinden, soğanlı mor çiçekli bir bitkidir. Safran, genellikle safran çiçeğinin renkli dişi organı, yumurta borusu ve tepelik (stigma) kısımlarının ayrılması ve gölgede kurutulması ile elde edilen baharat olarak kabul edilmektedir. Safran baharatının içeriğinde bulunan karotenoidlerden olan “krosin” altın sarısı renkte, suda çözünür, boyama gücü yüksek doğal bir boya maddesidir. Ayrıca safran, biyoaktif bileşenler sayesinde güçlü bir antioksidan ve antikanser etkiye sahiptir. Safran kendine özgü lezzet ve aroması ile dünya mutfaklarında aranan bir bahattır (Armellini vd., 2018).

Gıdaların yapısında yer alan karotenoidler, fenolik gruplar ve flavonoidler antioksidan etkiden sorumlu yapılardır. Bu sebeple safranın fenolik, flavonoid ve karotenoid içeriği sağlıklı beslenme açısından büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda oksijen radikallerinin yol açtığı birçok hastalığın tedavisinde bitkisel kaynaklı doğal antioksidanların kullanımı oldukça artış göstermektedir (Valizadeh, 1998; Assimopoulou vd., 2005; Görünmezoglu, 2008; Gismondi vd., 2012).

Safran 150’den fazla uçucu ve aroma özelliğine sahip bileşik içermektedir. Safranın biyoaktif bileşenleri iki ana başlık altında; suda çözünür ve yağda çözünür biyoaktif bileşenler olarak ayrılabilir. Bu biyoaktif bileşenlerinin çoğunluğunu aralarında zeaksantin, likopen, ve değişik α - ve β -karotenlerin de bulunduğu karotenoidler oluşturmaktadır. Safran altın sarısı-turuncu rengini suda çözünür karotenoidlerden olan krosine borçludur (Rahaiee vd., 2015).

Krosin doğal bir karotenoid bileşiktir. Gentiobioz adlı disakkarit ile krosetin adlı dikarboksilik asitten meydana gelen bir diesterdir. Parlak kırmızı renklidir ve suda çözünür kırmızı-turuncu bir çözelti oluşturmaktadır. Ayrıca güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir (Atefi, 2006). Bu bilgiler ışığında safranın antioksidan aktivite özelliğinin yapısında bulunan (suda çözünür) krosin ve diğer karotenoidlerden kaynaklandığı görülmektedir.

Bir gıda maddesinin toplam biyoaktif bileşenler açısından analizi için ilk adım; bu bileşenlerin ekstrakte edilmesidir. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar için ekstraksiyonun doğru şekilde yapılması gerekmektedir (Benthin vd., 1999). Gıda analizlerinde genellikle kullanılan ekstraksiyon yöntemleri; mekanik ekstraksiyon, distilasyon, çözücüler ile ekstraksiyon ve süperkritik sıvı ekstraksiyonu şeklinde sıralanabilmektedir. Gıdaların biyoaktif bileşen analizlerinde genellikle tercih edilen yöntem çözücülerle yapılan ekstraksiyon yöntemidir (Alan vd., 2007).

Ekstraksiyonun amacı örnek matriksinden etken maddeleri, inert veya arzu edilmeyen maddelerden ayırmak ve etken maddeyi daha derişik bir hale getirmektir. Bitki matriksinde bulunan önemli etken maddeler; biyoaktif bileşenler, alkaloidler, glikozitler, tanenler, resinler, uçucu yağlar, yağlar ve oleoresinlerdir. İncelediğimiz araştırmalarda safranın biyoaktif bileşen analizlerinde tek çözgen veya iki çözgen karışımları kullanılmıştır (Assimopoulou vd., 2005; Chatterjee vd., 2005; Karimi vd., 2010; Gismondi vd., 2012.; Zarinkamar vd., 2017; Ghanbari vd., 2019; Rikabad vd., 2019).

Bu çalışmanın amacı; kalite açısından birinci derece (TS/ISO 3632, 2011) bir safran örneğinin, farklı çözen sistemleri (aseton, saf su, etanol, metanol ve bunların farklı yüzdelerde karışımı) kullanılarak hazırlanan ekstraktlarının; toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan aktivite değişimini incelemek ve hangi çözen sisteminin toplam biyoaktif bileşenler açısından en yüksek değerlere sahip olduğunu saptamaktır.

MATERYAL VE METOT

Safran Örneği

Araştırmada kullanılan safran örneği (*Crocus sativus* L.) İran'ın Horasan Razavi ilinin, Maşhad şehrinde safran yetiştiren ve piyasaya arz eden Badei firmasından temin edilmiştir. Safran örneği eylül 2020 hasadı olup, vakumlu etüv (45°C, 4 saat, 0.6-0.8 P/cm²) ile kurutulmuştur. Işık ve su buharı geçirmeyen laminasyonlu ambalajlarda 6 gün içerisinde Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne ulaştırılıp, analizler süresince 4°C'da depolanmıştır.

Safran Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan safran baharatı, Safran Standardı (TS/ISO 3632, 2011) tarafından bildirilen prosedürler izlenerek renk (krosin), aroma (safranal) ve tat (pikrokrosin) içeriğine göre kalite açısından tanımlanmıştır (Çizelge 1). Analiz için 500 mg safran öğütüldükten sonra, 1 litre saf suda, 2 saat manyetik karıştırıcıda (Model-WiseShake-SHO-2D) oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra elde edilen çözeltiden 20 ml alınıp saf su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra safranın renk, aroma ve lezzet karakterlerinin incelenmesi için elde edilen 200 ml çözeltilinin sırasıyla 440, 330 ve 257 nm'de absorbansları spektrofotometre (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis) ile okunmuştur.

Safran Ekstraksiyonu

Bu çalışmada 13 farklı çözen sistemi (her çözen sistemi 40 ml olacak şekilde) hazırlanmıştır. Ekstraksiyon süresi ve kombine çözen sistemlerindeki oranlar (v/v), literatürdeki çalışmalar dikkate alınarak, her bir çözen miktarı %25'den düşük olmayacak şekilde ve toplam biyoaktif bileşen ve antioksidan aktivite değerleri maksimum olacak şekilde ön deneme çalışmaları

ile belirlenmiştir (Zarrinkamar vd., 2017; Ghanbari vd., 2019; Gani vd., 2021; Kothari vd., 2021).

13 çözen sistemindeki oranlar aşağıda sıralanmaktadır;

A/E: (Aseton/Etanol) (v/v, 50/50)

A/S/M/E: (Aseton/Su/Metanol/Etanol) (v/v/v/v, 25/25/25/25)

A/M: (Aseton/Metanol) (v/v, 50/50)

A/M/E: (Aseton/Metanol/Etanol) (v/v/v, 30/40/30)

A/S: (Aseton/Su) (v/v, 50/50)

A: (Aseton)

S: (Saf Su)

E: (Etanol)

M: (Metanol)

S/E: (Su/Etanol) (v/v, 50/50)

E/M: (Etanol/Metanol) (v/v, 50/50)

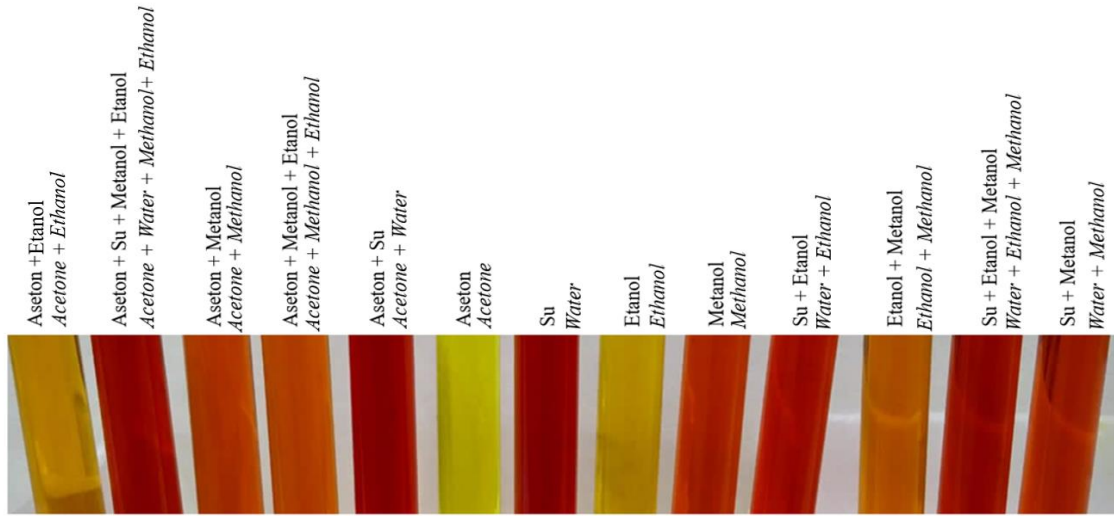
S/E/M: (Su/Etanol/Metanol) (v/v/v, 30/30/40)

S/M: (Su/Metanol) (v/v, 50/50)

Her farklı çözen sistemi için 2 gr safran baharatı öğütüldükten sonra karanlıkta 2 saat boyunca 100 rpm'e ayarlı çalkalamalı karıştırıcıda (Model-WiseShake-SHO-2D) ekstrakte edilmiştir. Daha sonra 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilip (Model-Mistral 1000) süpernatant kısmı analizlerde kullanılmıştır (Şekil 1).

Toplam Fenolik Madde Tayini

13 farklı çözen sistemi ile ekstrakte edilmiş safran örneklerinden ayrı ayrı 100 µl alınıp üzerine 7.5 ml saf su ve 500 µl Folin-Ciocalteu (FCR) reaktifi eklendikten sonra 3 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletilip vortekslenmiştir (WiseMix VM-10). Daha sonra 1 ml sodyum karbonat (Na₂CO₃) (%7 w/v) ilave edilip saf su ile 10 ml'ye tamamlanıp, iyice çalkalanmıştır. 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra absorbansı spektrofotometre ile 765 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Örneklerde bulunan toplam fenolik madde miktarı, daha önce farklı konsantrasyonlarda (50-600 ppm) hazırlanan gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) çözeltilerinin absorbans değerlerinden elde edilen standart eğri yardımıyla hesaplanmış, sonuçlar "mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g KM" olarak verilmiştir (Xu ve Chang, 2007).



Şekil 1. Safranın farklı çözgen sistemlerindeki ekstraktları

Figure 1. Extracts of saffron in different solvent systems

Toplam Flavonoid Madde Tayini

Farklı çözgen sistemleri ile ekstrakte edilmiş safran örneklerindeki toplam flavonoid miktarı önceki araştırmalarda önerilen spektrofotometrik yöntemler modifiye edilerek belirlenmiştir. (Singleton ve Rossi, 1965; Jia vd., 1999; Sánchez-Moreno, 2002). 13 farklı çözgen sistemi ile ekstrakte edilmiş safran örneklerinden ayrı ayrı deney tüpüne 250 µl alınarak üzerine 1.25 ml distile su ilave edilmiştir. Sıfırıncı dakikada 75 µl (%5 w/v) NaNO₂, 6. dakikada 150µl (%10 w/v) AlCl₃, 11. dakikada 0.5 ml 1M NaOH ve 275 µl distile su eklenerek karışımın absorbansı spektrofotometre ile 510 dalga boyunda ölçülmüştür. Örneklerde bulunan toplam flavonoid miktarı, daha önce farklı konsantrasyonlarda (50-600 ppm) hazırlanan kateşin ((2R,3S)-2-(3,4-Dihidroksifenil-3,4-dihidro-2H-1-benzopirran-3,5,7-triol) çözeltilerinin absorbans değerlerinden elde edilen standart eğri yardımıyla hesaplanmış, sonuçlar “mg kateşin eşdeğeri (KE)/100 g KM” olarak verilmiştir. Toplam flavonoid tayinlerinde genellikle Kateşin, Rutin eşdeğeri (RE) (α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranose) veya Kuersetin eşdeğeri (QE) (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone) kullanılmaktadır.

ABTS+ Radikali Yakalama Aktivitesi Analizi

ABTS⁺ (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal yakalama aktivitesi Re vd. (1999) göre gerçekleştirilmiştir. ABTS⁺ radikal katyonu, ABTS⁺ stok çözeltisinin (7mM); 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi ile karıştırılması ve karışımın kullanımdan önce 12-16 saat boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Ölçümler için stok çözeltisi 734 nm'de 0.700 absorbans değerini sağlayana kadar saf su ile seyreltilmiştir. 0.1 ml ekstrakta, 2 ml ABTS⁺ çözeltisi eklendikten sonra 6 dakika karanlıkta bekletilip, 734 nm'de absorbansı okunmuştur. ABTS⁺ testi için, trolks (±6-hidroksi2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboksilik asit) kalibrasyon eğrisi hazırlanıp, sonuçlar “mg trolks eşdeğeri (TE)/100 g KM” olarak ifade edilmiştir. ABTS⁺, serbest radikal süpürme inhibisyonu (%) aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \left[\frac{(AA-AN)}{AA} \right] \times 100$$

AA = ABTS⁺ absorbans değeri

AN = Numune absorbans değeri

DPPH Radikal Yakalama Kapasitesi Analizi

Safran örneklerinden elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitelerinin ölçümü DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal indirgeme aktivitesi metoduna göre yapılmıştır (Singleton ve

Rossi, 1965; Brand-Williams vd., 1995; Sánchez-Moreno, 2002). 6×10^{-5} M DPPH saf metanolde günlük olarak hazırlanmıştır. 0.1 ml örnek ekstraktı ya da standart üzerine 4.9 ml metanolik DPPH eklenmiştir. Elde edilen bu karışım 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 517 nm'de köre karşı absorbanı spektrofotometre cihazı ile okunmuştur. Analiz için (50-600) ppm troloks kalibrasyon eğrisi hazırlanıp, sonuçlar "mg troloks eşdeğeri (TE)/100 g KM" olarak ifade edilmiştir. DPPH, serbest radikal süpürme inhibisyonu (%) aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \left[\frac{(AK-AN)}{AK} \right] \times 100$$

AK = Kontrol absorbanı değeri

AN = Numune absorbanı değeri

İstatistiksel Analiz

Çalışmalarda 2 tekerrürlü 3 paralel tesadüf parselleri deneme deseni kullanılmıştır (n=6). Sonuçların değerlendirilmesinde Anova one-way analizinden yararlanılmıştır. Bu istatistiksel analiz sonucunda önemli çıkan faktörlerin ($P < 0.05$) alt grup ortalamaları çoklu karşılaştırma yöntemine

(Duncan) göre karşılaştırılmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında korelasyon olup olmadığı regrasyon testi yardımıyla saptanmıştır. Yapılan tüm istatistiksel testlerde anlamlılık düzeyi ($P < 0.05$) olarak kabul edilmiştir. Tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS 25 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Safran Karakterizasyonu

Çalışmamızda materyal olarak kullanılan İran Badei marka safran örneğinde krosin (renk) değeri 198, pikrokrosin (lezzet) değeri 72 ve safranal (aroma) değeri 38 olarak saptanmıştır (Çizelge 2). Bu değerler Çizelge 1'deki safran standart değerleri (Safran Standart; TS/ISO 3632, 2011) ile karşılaştırıldığında krosin ve Pikrokrosin açısından birinci dereceden daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. Safranal açısından maksimum soğurma değeri standartta verilen 20-50 değerleri arasındadır. Bu durum göz önüne alındığında safran örneğimiz birinci kalite olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 1. Safranın kalite derecelendirilmesindeki minimum kriterler (TS/ISO 3632, 2011)

Table 1. Minimum criteria for quality grading of saffron (TS/ISO 3632, 2011)

	I Derece <i>I Degree</i>	II Derece <i>II Degree</i>	III Derece <i>III Degree</i>	IV Derece <i>IV Degree</i>
Krosin (renk) <i>Crocin (color)</i>	190	150	110	80
Pikrokrosin (lezzet) <i>Picrocrocin (flavor)</i>	70	55	40	30
Safranal (Aroma) <i>Safranal (Aroma)</i>	20–50	20–50	20–50	20–50

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan safran'a ait kalite kriterleri

Table 2. Quality criteria of saffron used in the study

Kriterler <i>Criteria</i>	Absorbans <i>Absorbance</i>	Maksimum Soğurma (λ (max)) <i>Maximum Absorption (λ (max))</i>
Krosin (Renk) $A^{%1}_{1cm, 440 \text{ nm}}$ <i>Crocin (color) $A^{%1}_{1cm, 440 \text{ nm}}$</i>	0.8910	198
Pikrokrosin (Lezzet) $A^{%1}_{1cm, 257 \text{ nm}}$ <i>Picrocrocin (flavor) $A^{%1}_{1cm, 257 \text{ nm}}$</i>	0.3240	72
Safranal (Aroma) $A^{%1}_{1cm, 330 \text{ nm}}$ <i>Safranal (Aroma) $A^{%1}_{1cm, 330 \text{ nm}}$</i>	0.1710	38

Toplam Fenolik Madde ve Toplam Flavonoid Tayinleri

Safranın farklı çözen sistemlerindeki toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı yüksek oranlarda değişiklik göstermektedir ($P < 0.05$) (Çizelge 3). Analiz sonuçlarını incelediğimizde toplam fenolik madde miktarı 13 farklı çözen sistemlerinde sırasıyla; S/E/M > S/M > A/S > A/S/M/E > S > M > S/E > A/M > A/M/E > E/M > A/E > E > A, olarak belirlenirken, toplam flavonoid miktarı ise; S/E/M > S/M > A/S/M/E > A/M/E > A/M > E/M > M > S/E > A/S > S > E > A/E > A olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek toplam fenolik (2265.00 mg GAE/100 g KM) ve flavonoid madde miktarı (587.14 mg KE/100 g KM), su/etanol/metanol (v/v/v, 30/30/40), kombinasyonu ile hazırlanan çözen ekstraktında saptanırken, en düşük toplam fenolik (40.00 mg GAE/100 g KM) ve flavonoid madde miktarı (00.00 mg KE/100 g KM), aseton ile ekstrakte edilen örneklerde elde edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde safranın biyoaktif bileşen ekstraktlarında genellikle tek veya iki kombine çözen sistemleri kullanılmıştır (Amin vd., 2011; Makhlouf vd., 2011). Karimi vd. (2010) gerçekleştirdikleri çalışmada safranın toplam fenolik, flavonoid madde miktarları ve antioksidan aktivite analizi için 3 farklı çözen (su, metanol ve etanol) kullanmışlardır. Toplam fenolik madde miktarı en yüksek sırasıyla metanol (650 mg GAE/100 g KM), etanol (630 mg GAE/100 g KM) ve su (570 mg GAE/100 g KM) ekstraktlarında saptanırken, flavonoid miktarı sırasıyla metanol (580 mg Rutin/100 g KM), su (380 mg Rutin/100 g KM) ve etanol (290 mg Rutin/100 g KM) ekstraktlarında saptanmıştır.

Farklı gübre kullanımının safran bitkisinde (*Crocus sativus* L.) çiçeklenme, soğan özellikleri, biyoaktif bileşenler ve antioksidan aktivite üzerine etkisi araştırılan bir diğer çalışmada, biyoaktif bileşen ve antioksidan aktivite analizleri için su/metanol (v/v, 20/80) karışımı kullanılmıştır. Toplam

fenolik ve flavonoid madde miktarı sırasıyla 591 mg GAE/100 g KM ve 451 mg KE/100 g KM olarak belirlenmiştir (Ghanbari vd., 2019).

Zarrinkamar vd. (2017) yaptıkları çalışmada safran bitkisinde stigma, taç yaprağı, yaprak ve soğanının biyoaktif bileşenlerini kıyaslamışlardır. Safran baharat (stigma) ekstraktı için su/metanol (v/v, 20/80) karışımı kullanılan çalışmada, safran baharatında toplam fenolik madde 643 mg GAE/100 g KM ve toplam flavonoid 233 mg Rutin/100 g KM olarak saptanmıştır. Farklı sulama yöntemlerinin safran ekstraktında toplam fenolik ve flavonoid madde ve antioksidan aktivite etkisi araştırılan çalışmada ise çözen olarak su/etanol (v/v, 20/80) kullanılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı 606 mg GAE/100 g KM ve toplam flavonoid miktarı 149 mg KE/100 g KM olarak elde edilmiştir (Dehghani-Bidgoli vd., 2018). Başka bir çalışmada batı Himalaya'nın farklı bölgelerinde yetişen safranların toplam fenolik ve flavonoid madde miktar analizleri için su/metanol (v/v, 30/70) karışımı kullanılmıştır. Analizler 3 küme (her küme 2 farklı bölgede yetişen safran karışımı) halinde gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı üç küme için en yüksek 710 mg GAE/100 g KM ve en düşük 540 mg GAE/100 g KM saptanırken, toplam flavonoid madde miktarında en yüksek 550 mg KE/100 g KM ve en düşük 340 mg KE/100 g KM olarak bulunmuştur (Kothari vd., 2021). Yapılan başka bir çalışmada, araştırmacılar safran ve yalancı iğdenin (yer iğdesi) biyoaktif bileşenlerini enkapsüle ederek düşük glesimik fırın ürünlerinde kullanımını incelemişlerdir. Bu çalışmada safran ekstraktı için ultrason destekli su/metanol (v/v, 20/80) çözen karışımı kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarını incelediğimizde enkapsüle olmamış safran için toplam fenolik madde miktarı 570 mg GAE/100 g KM ve antioksidan aktivite serbest radikal süpürme yüzdesi 68.39 iken, enkapsüle olmuş safran için toplam fenolik madde miktarı 341 mg GAE/100 g KM ve antioksidan aktivite serbest radikal süpürme yüzdesi 61.30 olarak saptanmıştır (Gani vd., 2021).

Farklı çözümlerin safranın biyoaktif bileşen miktarına etkisi

Çizelge 3. Farklı çözümlerinde ekstrakte edilmiş safranın toplam fenolik madde ve toplam flavonoid içerikleri

Table 3. Total phenolic substance and total flavonoid contents of saffron extracted in different solvent systems

Çözgen Sistemleri* Solvent Systems*	Toplam Fenolik Madde mg GAE**/100 g KM*** Total Phenolic Content mg GAE**/100 g DM***	Toplam Flavonoid Madde mg KE****/100 g KM Total Flavonoid Content mg CE****/100 g DM
A/E	182.50±1.06 ^{c*****}	70.71±2.54 ^b
A/S/M/E	1582.50±0.60 ^j	447.85±1.56 ^k
A/M	497.50±0.83 ^f	339.28±1.52 ⁱ
A/M/E	464.91±1.17 ^e	362.85±1.90 ^j
A/S	1887.50±0.51 ^k	212.14±1.82 ^e
A	40.00±2.10 ^a	0.00±0.00 ^a
S	1230.00±0.71 ⁱ	206.80±2.29 ^d
E	105.28±1.02 ^b	75.00±1.59 ^c
M	1020.00±1.47 ^h	283.58±0.89 ^g
S/E	860.00±1.79 ^g	273.57±1.03 ^f
E/M	282.00±1.35 ^d	299.28±2.24 ^h
S/E/M	2265.00±0.82 ^m	587.14±1.95 ^m
S/M	2005.00±1.78 ^l	481.42±2.07 ^l
En düşük Min	40.00	0.00
En yüksek Max	2265.00	587.14
Ortalama Mean	955.55	279.97

*Çalışmada kullanılan çözümler sistemleri: A/E: Aseton+Etanol, A/S/M/E: Aseton+Su+Metanol+Etanol, A/M: Aseton+Metanol, A/M/E: Aseton+Metanol+Etanol, A/S: Aseton+Su, A: Aseton, S: Su, E: Etanol, M: Metanol, S/E: Su+Etanol, E/M: Etanol+Metanol, S/E/M: Su+Etanol+Metanol, S/M: Su+Metanol.

*Solvent systems used in the study: A/E: Acetone+Ethanol, A/W/M/E: Acetone+Water+Methanol+Ethanol, A/M: Acetone+Methanol, A/M/E: Acetone+Methanol+Ethanol, A/W: Acetone+Water, A: Acetone, W: Water, E: Ethanol, M: Methanol, W/E: Water+Ethanol, E/M: Ethanol+Methanol, W/E/M: Water+Ethanol+Methanol, W/M: Water+Methanol.

**GAE: Gallik Asit Eşdeğeri.

**GAE: Gallic Acid Equivalent.

*** KM: Kuru Madde

***DM: Dry Matter

**** KE: Kateşin Eşdeğeri.

****CE: Catechin Equivalent.

***** Her sütündeki farklı harfler; değerler arasında istatistiksel fark olduğunu belirtmektedir (P < 0.05).

***** Different letters in each column; indicates that there is a statistical difference between the values (P < 0.05).

Amin vd. (2011) yaptıkları araştırmada safranın toplam fenolik madde analizi için su/etanol (v/v, 20/80) karışımı ve saf su kullanmışlardır. Toplam fenolik madde miktarı su/etanol (v/v, 20/80) ekstraktında 67.62 mg GAE/100 g KM iken, saf su ekstraktında 64.25 mg GAE/100 g KM olarak saptanmıştır. Yapılan farklı bir araştırmada ise Lübnan'da yetiştirilen safranın toplam fenolik madde miktarı için saf su kullanılmıştır. Elde edilen toplam fenolik madde miktarı 1600 mg GAE/100 g KM olarak belirlenmiştir (Makhlouf vd., 2011).

Antioksidan Aktivite

Farklı çözümler ile ekstrakte edilmiş safran örneğinin antioksidan aktivite ve serbest radikal süpürme inhibisyon oranları (DPPH)(ABTS+) Çizelge 4'de verilmiştir. Analiz sonuçlarını incelediğimizde troloks eşdeğeri ve antioksidan inhibisyon yüzdesinde en yüksek miktar su/etanol/metanol (v/v/v, 30/30/40) kombinasyonu ile hazırlanan çözümler ekstraktında iken, en düşük miktar aseton ile ekstrakte edilen örneklerde saptanmıştır. Yapılan araştırmalar incelendiğinde, antioksidan aktivite bulgularımız Karimi vd. (2010) çalışma sonuçları ile kısmen bir paralellik gösterirken, Amini vd. (2011) tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermemektedir. Safran bitkisinin stigma, taç yaprağı, yaprak ve soğanının incelendiği çalışmada safran stigmasının %71 inhibisyon yüzdesi ile diğer organlara göre en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Zarrinkamar vd., 2017). Bir diğer çalışmada ise safran stigmasının antioksidan aktivite değeri (DPPH) 470 mg TE/100 g KM olarak saptanmıştır (Ghanbari vd., 2019). Ayrıca Dehghani-Bidgoli vd. (2018) yaptıkları araştırma sonucunda antioksidan aktivite inhibisyon yüzdesini, %92.01 olarak elde etmişlerdir.

Farklı bitkilerin incelendiği çalışmada safran, zerdeçal ve keklük baharatının antioksidan aktivite analizleri (DPPH, ABTS, ORAK) için ekstraksiyon aşamasında çözümler olarak metanol ve ultrasonik banyo yöntemi kullanılmıştır. Söz konusu üç örnekte de en düşük değerler safran örneğinde saptanmıştır (Ordoudi vd., 2009). Başka bir çalışmada ise safran baharatının alzheimer hastalığının sebeplerinden olan; insan beyninde toplanan, amiloid- β fibrillojenezi inhibe

etme özelliği ve antioksidan aktivite (TEAC) değeri domates ve havuç ile kıyaslanmıştır. Safran ekstraktı için su/metanol (v/v, 50/50) karışımı çözümler kullanılan bu çalışma sonucunda, safranın antioksidan aktivite etkisi havuç ve domatese kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Papandreou vd., 2006).

Okmen vd. (2021) yaptıkları çalışmada farklı baharat özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada baharat ekstraktları için üç farklı çözümler (etanol, metanol ve su) kullanılmıştır. Safran baharatı için (DPPH) inhibisyon yüzdesi ve antioksidan aktivite troloks eşdeğerleri sırasıyla, etanol ekstraktı için %72.8 ve 404.66 mg TE/100 g KM, metanol ekstraktı için %82.8 ve 398.00 mg TE/100 g KM ve su ekstraktı için %44.1 ve 271.33 mg TE/100 g KM olarak saptanmıştır.

Katı-sıvı ekstraksiyonunun verimi birçok faktöre bağlıdır. Kullanılan çözümlerin türü ve kimyasal yapısı, çözümlenen maddenin bağ türleri ve sayısı, pH, katı-sıvı oranı ve sıcaklık gibi parametreler bu faktörlerdendir. Ekstraksiyonun verimliliği üzerine temelde üç faktörün etkili olduğu bildirilmektedir. Bu üç faktör çözümlenirlik, kütle transferi ve matris etkisidir. Doğru çözümler seçimi, hedef bileşimin ayrışmasını etkileyen en önemli faktördür. Çünkü hedef bileşimin çözümlenirliği, çözümler türüne bağlıdır. Hedeflenen bileşimin polaritesi, çözümler seçimi için en önemli faktördür (Bosiljkov vd., 2017).

Safran'daki biyoaktif bileşenler genellikle karotenoid, fenolik ve flavonoid bileşiklerden oluşmaktadır. Safran'daki karotenoidler iki ana gruba (suda çözümlenen ve yağda çözümlenen) ayrılmaktadır (Atefi, 2006). Safranın en önemli bileşeni olan krosin suda çözümlenen bir karotenoiddir. Krosin güçlü bir antioksidandır (Gismondi vd., 2012). Bu doğrultuda safran ekstraksiyonunda kullanılan çözümler sistemlerinde suyun önemi ortaya çıkmaktadır. Ayrıca yapılan literatür incelemesinde fenolik ve flavonoid bileşiklerin ekstraksiyonunda genellikle metanol ve etanol kullanılmaktadır (Karimi vd., 2010; Amin vd., 2011; Makhlouf vd., 2011; Kothari vd., 2021; Gani vd., 2021).

Farklı çözümlerin safranın biyoaktif bileşen miktarına etkisi

Çizelge 4. Farklı çözümlerinde ekstrakte edilmiş safranın antioksidan aktivite ve radikal temizleme inhibisyon değerleri

Table 4. Antioxidant activity and radical scavenging inhibition values of saffron extracted in different solvent systems

Çözgen Sistemleri* Solvent Systems*	DPPH Radikali Süpürme (%) DPPH Radical Scavenging (%)	DPPH (mg TE**/100 g KM***) DPPH (mg TE**/100 g DM***)	ABTS+ Radikali Süpürme (%) ABTS+ Radical Scavenging (%)	ABTS+ (mg TE/100g KM) ABTS+ (mg TE/100 g DM)
A/E	7.99±1.06 ^{a****}	283.96±2.14 ^c	8.19±0.92 ^a	301.17±2.40 ^c
A/E				
A/S/M/E	18.99±1.30 ^e	674.91±1.90 ⁱ	21.04±2.06 ^f	713.59±2.94 ⁱ
A/W/M/E				
A/M	14.79±0.34 ^d	525.64±3.79 ^f	15.28±0.53 ^d	554.43±1.64 ^g
A/M				
A/M/E	15.30±1.26 ^d	543.76±1.65 ^g	17.70±1.21 ^e	591.73±1.88 ^h
A/M/E				
A/S	17.44±0.65 ^e	619.82±1.53 ^h	20.29±0.91 ^f	653.45±2.64 ⁱ
A/W				
A	6.67±0.54 ^a	237.05±3.30 ^a	6.81±0.80 ^a	251.23±2.20 ^a
A				
S	17.67±0.56 ^e	628.00±11.98 ⁱ	21.17±1.11 ^f	736.28±1.67 ^k
W				
E	6.54±0.56 ^a	232.43±4.04 ^a	7.10±0.61 ^a	267.54±2.84 ^b
E				
M	7.62±0.29 ^a	270.81±5.79 ^b	9.54±1.10 ^b	311.64±2.21 ^d
M				
S/E	12.70±0.65 ^c	451.36±1.90 ^e	14.46±1.31 ^d	494.67±2.61 ^f
W/E				
E/M	9.88±0.64 ^b	351.13±3.27 ^d	12.54±1.07 ^c	398.33±2.78 ^e
E/M				
S/E/M	32.34±4.30 ^f	1202.68±2.40 ^k	33.31±1.33 ^g	1383.74±1.77 ^l
W/E/M				
S/M	15.36±0.31 ^d	545.90±5.78 ^g	18.13±1.37 ^e	593.43±2.09 ^h
W/M				
En düşük Min	6.54	232.43	6.81	251.23
En yüksek Max	32.34	1202.68	33.31	1383.74
Ortalama Mean	14.09	505.18	15.81	557.78

*Çalışmada kullanılan çözümler sistemleri: A/E: Aseton+Etanol, A/S/M/E: Aseton+Su+Metanol+Etanol, A/M: Aseton+Metanol, A/M/E: Aseton+Metanol+Etanol, A/S: Aseton+Su, A: Aseton, S: Su, E: Etanol, M: Metanol, S/E: Su+Etanol, E/M: Etanol+Metanol, S/E/M: Su+Etanol+Metanol, S/M: Su+Metanol.

*Solvent systems used in the study: A/E: Acetone+Ethanol, A/W/M/E: Acetone+Water+Methanol+Ethanol, A/M: Acetone+Methanol, A/M/E: Acetone+Methanol+Ethanol, A/W: Acetone+Water, A: Acetone, W: Water, E: Ethanol, M: Methanol, W/E: Water+Ethanol, E/M: Ethanol+Methanol, W/E/M: Water+Ethanol+Methanol, W/M: Water+Methanol.

**TE: Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite

**TE: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

*** KM: Kuru Madde

***DM: Dry Matter

**** Her sütündeki farklı harfler; değerler arasında istatistiksel fark olduğunu belirtmektedir (P < 0.05).

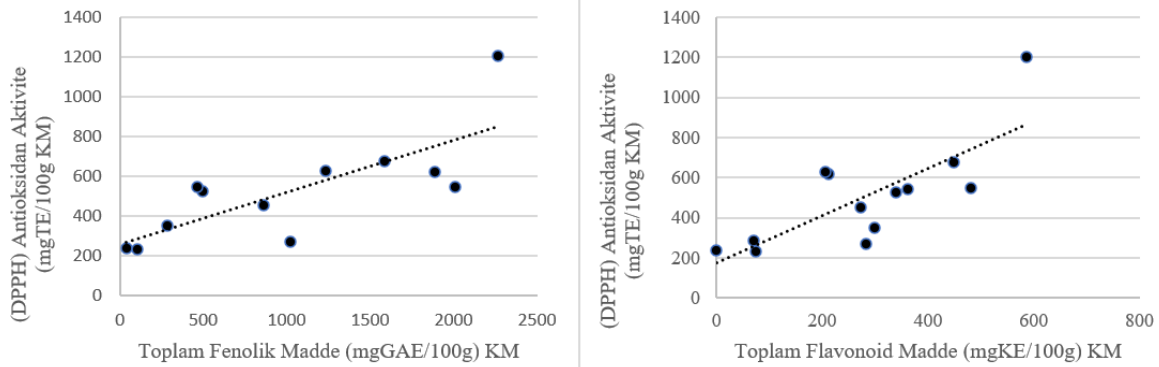
**** Different letters in each column; indicates that there is a statistical difference between the values (P < 0.05).

Safran'daki biyoaktif bileşenleri oluşturan karotenoid, fenolik ve flavonoid bileşiklerin ekstraktı için kombine bir çözgen sistemi kullanmak ekstrakt verimini yükseltecektir. Nitekim çalışmamızda toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan aktivite değerleri en yüksek su/etanol /metanol kombinasyonu ile hazırlanan ekstraktlarda saptanmıştır. Bu nedenle safrandaki biyoaktif bileşen ekstraksiyonunda tek çözgen yerine kombine bir çözgen sistemi kullanmak daha yüksek bir verim sağlayacaktır.

Ayrıca bu çalışmada kullanılan safran örneklerinde toplam fenolik madde ve flavonoid

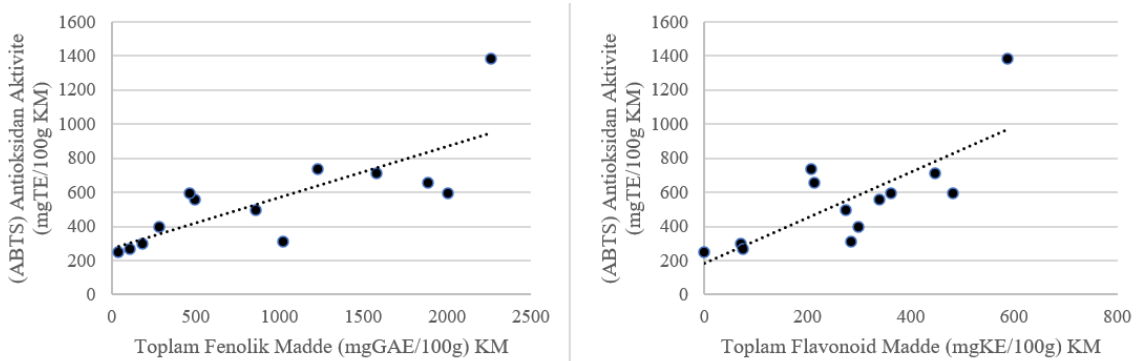
madde miktarları ile antioksidan aktivite arasında güçlü pozitif korelasyon ilişkisi saptanmıştır.

DPPH antioksidan aktivite sonuçları ile toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları arasındaki korelasyon katsayısı sırasıyla, $r=0.78$ ve $r=0.77$ olarak belirlenirken, ABTS⁺ antioksidan aktivite sonuçları ile toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları arasındaki korelasyon katsayısı sırasıyla $r=0.77$ ve $r=0.75$ olarak saptanmıştır (Şekil 2,3). Elde ettiğimiz toplam fenolik madde ve flavonoid madde miktarları ile antioksidan aktivite arasındaki güçlü pozitif korelasyon ilişkisi, Rahaiee vd. (2015) yaptıkları çalışma ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 2. Toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ile (DPPH) antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki

Figure 2. The relationship between total phenolic and flavonoid content and (DPPH) antioxidant activity



Şekil 3. Toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ile (ABTS⁺) antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki

Figure 3. The relationship between total phenolic and flavonoid content and (ABTS⁺) antioxidant activity

SONUÇ

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ışığında, safranın toplam biyoaktif bileşenlerinin ekstraktı için kombine çözgen sistemlerin daha etkili

olduğu belirlenmiştir. Nitekim bu sonuçlar doğrultusunda toplam fenolik, toplam flavonoid madde ve antioksidan aktivite açısından su, etanol ve metanol kombinasyonu en etkin çözgen

sistemi olarak saptanmıştır. Böylelikle safrandaki bioaktif bileşenlerin ekstraktı için su/etanol/metanol kombine çözen sistemlerinin kullanımı önerilmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makale ile ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında bir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

Bu makalenin hazırlanmasında yazarların katkı payı şöyledir: Saeid Chobdar Rahim: %50 (deneme planının kurgulanması, analizlerin yapılması ve makalenin yazımı); Janan Hossein Zadeh: %20 (analizlerin yürütülmesi); Fikret Pazır: %15 (sonuçların değerlendirilmesi ve makale yazımı); Gülden Ova: %15 (sonuçların değerlendirilmesi ve makale yazımı).

KAYNAKLAR

Alan, T.W.E., Ming, Y.H., Eng, S.O. (2007). Evaluation of surfactant assisted pressurized liquid extraction for the determination of glycyrrhizin and ephedrine in medicinal plants. *Anal Chim Acta*, 583: 289–295, DOI: 10.1016/j.aca.2006.09.019.

Amin, A., Hamza, A.A., Bajbouj, K., Ashraf, S.S., Daoud, S., Ashraf, S.S., Daoud, S. (2011). Saffron: potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 54: 857-867, DOI: 10.1002/hep.24433.

Armellinia, R., Peinadoc, I., Pittiab, P., Scampicchio, M., Herediac, A., Andresc, A. 2018. Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) enrichment on antioxidant and sensorial properties of wheat flour pasta. *Food chem*, 254, 55–63, DOI:org/10.1016/j.

Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z., Papageorgiou, V.P. (2005). Radical scavenging activity of (*Crocus sativus* L.) extract and its bioactive constituents. *Phytother Res*, 19: 997–1000, DOI: 10.1002/ptr.1749.

Atefi, M.S. (2006). *Chemistry, quality control and processing of saffron*. Publications Mesopotamia Mashad :17-24, ISBN: 978-964-92029-2-1.,Sayı:2.

Benthin, B., Danz, H., Hamburger, M. (1999). Pressurized liquid extraction of medicinal plants.

J Chromatogr A, 837: 211–219, DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00071-0.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol*, 28: 25-30, DOI: S0023-6438(95)80008-5.

Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Radojčić Redovniković, I. and Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *FBP*, 102, 195-203.

Chatterjee, S., Poduval, TB., Tilak, J.C., Devasagayam, T.P.A. (2005). A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus* L.). *Clin Chim Acta*, 352: 155–163, DOI: 10.1016/j.cccn.

Dehghani-Bidgoli, R., Salari, A., Bashiri, M. (2018). The effect of various irrigation regimes on phenolic compounds and antioxidant activity of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma extract. *Journal of saffron research* 7 (1) :109-122, DOI: 10.22077/JSR.2018.1006.1042.

Gani, A., Jan, R., Ashwar, B.A., Ashraf, Z., Shah, A., Gani, A. (2021). Encapsulation of saffron (*Crocus sativus* L.) and sea buckthorn bioactives: Its utilization for development of low glycemic baked product for growing diabetic population of the World. *LWT- Food SCI Technol*, 142,111035, DOI:10.1016/j.lwt. 2021.111035.

Ghanbari, J., Khajoei-Nejad, G., van Ruth, S.M., Aghighi, S., (2019). The possibility for improvement of flowering, corm properties, bioactive compounds, and antioxidant activity in saffron (*Crocus sativus* L.) by different nutritional regimes. *Ind Crops Prod*. Volume: 135 Pages: 301-310., DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.04.064.

Gismondi, A., Serio, M., Canuti, L., Canini, A. (2012). Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of italian saffron (*Crocus sativus* L.). *Am. J. Plant Sci.*, 11: 1573-1580. DOI: 10.4236/ajps.2012.311190.

Görünmezoglu, Ö. (2008). Kayısı ve incir meyvelerinin antioksidan kapasitelerinin

- araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, Türkiye. Sayfa:1.
- Jia, Z., Tang, M.C., Wu, J.M. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chem* 64(4): 555-559, DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Hawa, Z., Jaafar, E. (2010). Evaluation of (*Crocus sativus* L.) stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules* 15: 6244-6256, DOI:10.3390/molecules15096244.
- Makhlouf, H., Saksouk, M., Habib, J., Chahine, R. (2011). Determination of antioxidant activity of saffron taken from the flower of (*Crocus sativus* L.) grown in Lebanon. *Afr. J. Biotechnol*, 10(41): 8093-8100, DOI: 10.5897/AJB11.406.
- Kothari, D., Thakur, M., Joshi, R., Kumar, A., Kumar, R. (2021). Agro-Climatic Suitability Evaluation for Saffron (*Crocus sativus* L.) Production in Areas of Western Himalaya. *Front. Plant Sci.* 12-657819, DOI: 10.3389/fpls.2021.657819.
- Okmen, G., Arslan, k., Tekin, R., Camur, I., Gorda, S. (2021). Antimicrobial and antioksidant activities of different spice extracts. *EJOSAT*. Special Issue, pp. 421-429, DOI: 10.31590/ejosat.848958.
- Ordoudi, S.A., Befani, C.D., Nenadis, N., Koliakos, G.G., Tsimidou, M.Z. (2009). Further examination of antiradical properties of (*Crocus sativus* L.) stigmas extract rich in crocins. *J. Agric. Food Chem* 57: 3080-3086, DOI: 10.1021/jf804041g.
- Papandreou, M.A., Kanakis, C.D., Polissiou, M.G., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Margaritis, M., Lamari, F.N. (2006). Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of (*Crocus sativus* L.) stigmas extract and its crocin constituents. *J. Agric. Food Chem*, 54 (23): 8762-8768, DOI: 10.1021/jf061932a.
- Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M., Shojaosadati, S.A. (2015). Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review. *Int J Food Sci Technol* (MYSORE) 52(4): 1881-1888, DOI: 10.1007/s13197-013-1238-x.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9- 10): 1231-1237, DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Rikabad, M.M., Pourakbar, L., Moghaddam, S.S., Popovic-Djordjevic, J. (2019). Agrobiological, chemical and antioxidant properties of saffron (*Crocus sativus* L.) exposed to TiO₂ nanoparticles and ultraviolet-B stress. *Ind Crops Prod* 137: 137-143, DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.108201.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 8(3):121-137, DOI: org / 10.1106 / 108201302026770.
- Singleton, V.L., Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16: 144-158, DOI: org/10.12691/ijebb-2-1-5.
- TSE ISO/TS 3632-1/2, (2011); Baharat-Safran (*Crocus Sativus Linnaeus*) - Bölüm 1: Özellikler, Safran (*Crocus Sativus Linnaeus*)- Bölüm 2: Deney Yöntemleri, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Valizadeh, R. (1988). Use of saffron (*Crocus sativus* L.)leaves as animal feed. Annual report. *Scientific and Industrial Research Organization of Khorasan*, Mashhad, Iran. (Technical report).
- Xu, B.J., Chang, S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvent. *J Food Sci* 72 (2): S159-S166, DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x.
- Zarinkamar, F., Tajik, S., Niknam, V. (2017). Evaluation of antioxidant activity and phenolic content from saffron (*Crocus sativus* L.) organs (*Crocus sativus* L.). *Iran J Biotechnol* 8 (2): 160-170, biot.modares.ac.ir/article-22-119-fa.html.