

بررسی خواص آنتی‌اکسیدان عصاره‌های جلبک دریایی *Cystoseira trinodis* از سواحل چابهار

علی طاهری^{۱*}، مصطفی غفاری^۲، نرگس سادات باقرپور^۳، گیلان عطاران فریمان^۴

چکیده

مقدمه: ماکرو جلبک‌های دریایی در داروسازی، پزشکی، صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شوند. ترکیبات زیستی فعال موجود در جلبک‌ها دارای اثرات گسترده ضدباکتریایی، ضدتومور، ضدقارچ، آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان هستند. در تحقیق حاضر، خواص آنتی‌اکسیدان عصاره‌های آلی جلبک دریایی *Cystoseira trinodis* جمع‌آوری شده از خلیج چابهار مورد بررسی قرار گرفت. روش بررسی: در این مطالعه تجربی عصاره‌های متانولی، کلروفرمی، اتیل استاتی و ان-هگزانی جلبک دریایی *Cystoseira trinodis* تهیه گردید. به منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدان عصاره‌های جلبکی از روش مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت کلاته‌کنندگی یون آهن و فعالیت احیاء‌کنندگی استفاده شد. در این مطالعه از One Way ANOVA جهت بررسی داده‌ها و آزمون Tukey برای مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار Graphpad-Prism 6 استفاده شد.

نتایج: نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان جلبک‌ها نشان داد که بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدان بر اساس آزمون DPPH برای جلبک *Cystoseira trinodis* به ترتیب مربوط به عصاره اتیل استاتی (۹۲±۴/۹۶٪ مهار)، در آزمون فعالیت کلاته‌کنندگی یون آهن مربوط به عصاره اتیل استاتی با ۰/۳۱ ± ۰/۶۰/۹۲٪ فعالیت و در آزمون فعالیت احیاء‌کنندگی مربوط به عصاره کلروفرمی با میزان جذب ۰/۸۸۵±۰/۰۳ در غلظت ۱ mg/ml بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره‌های مختلف جلبک *Cystoseira trinodis* دارای توان آنتی‌اکسیدانی و با درجه‌های متفاوتی می‌باشند و می‌توان از این ترکیبات به عنوان یک ابزار درمانی مؤثر استفاده نمود. این امر نیاز به تحقیقات بیشتر و خالص‌سازی و استخراج ترکیبات تشکیل دهنده عصاره جهت شناسایی مؤثرترین ترکیب این جلبک را دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، جلبک دریایی، رادیکال آزاد، خلیج چابهار، سیستم‌سورا ترینودیز

۱- دانشیار عمل آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

۲- دانشیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

۳- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۵۴۳۱۲۷ ۲۰۹۵، پست الکترونیکی: taherienator@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۶

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که از طریق مهار شروع و یا جلوگیری از انتشار واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیدکننده می‌توانند سبب تأخیر و یا جلوگیری از اکسیداسیون لایه‌های سلولی شوند (۱)؛ معمولاً این مواد درون بدن موجود زنده جهت حفظ هموستازی در برابر استرس‌های اکسیداتیو تولید می‌شود. اکسیداسیون سلولی از طریق شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH°)، آنیون سوپراکسید ($O_2^{\circ-}$) و نیتریک اکسید (NO°) که به عنوان گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) شناخته می‌شوند، آغاز می‌شود. این رادیکال‌ها در سیستم‌های بیولوژیکی به دلیل تنش‌های سلولی مختلف سنتز می‌شوند (۲). جهت مهار این رادیکال‌ها از آنتی‌اکسیدان‌ها به طور گسترده‌ای به عنوان افزودنی مواد غذایی جهت حفاظت در برابر تخریب اکسیداتیو در مواد غذایی و روغن‌ها استفاده می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی که بیشترین استفاده را دارند شامل: پروپیل گالات (PG)، بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و ترشری بوتیل هیدروکسی کوئینون (TBHQ) می‌باشند (۳). با این حال به نظر می‌رسد که BHT و BHA مسئول آسیب‌های کبدی و سرطان باشند (۴-۶). اثرات سمی و جهش‌زای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و در کنار آن تمایل مصرف‌کنندگان به افزودنی‌های غذایی طبیعی سبب شده است که تلاش‌هایی جهت توسعه آنتی‌اکسیدان‌های جایگزین با منشأ طبیعی صورت گیرد (۷).

جلبک‌های دریایی یکی از غنی‌ترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌روند (۸). عمده فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌ها به خاطر وجود توکوفرول‌ها (۹)، کاروتنوئیدها (۱۰) و پلی‌فنول‌ها (۱۱) است. توکوفرول‌ها و پلی‌فنول‌ها گیرنده رادیکال‌های آزاد هستند، در نتیجه از طریق شکستن زنجیره اکسیداسیون به عنوان آنتی‌اکسیدان اقدام می‌کنند؛ در حالی که کاروتنوئیدها می‌توانند با فراهم کردن اکسیژن یگانه و یا به دام انداختن رادیکال‌های آزاد، عمل آنتی‌اکسیدانی خود را انجام دهند. جلبک‌های قهوه‌ای نیز به دلیل وجود پلی‌ساکاریدهای

مختلف مانند فوکوئیدان، لامینارین و آلژینیک اسید دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه‌ای می‌باشند (۱۲).

جلبک‌های موجود در منابع دریایی جنوب کشور یکی از ظرفیت‌های زیستی ارزشمند کشور هستند که توجه چندانی به آن‌ها نشده است و برنامه‌ریزی اصولی و مدونی برای بهره‌برداری از این ذخایر دریایی وجود ندارد (۱۳). در خلیج چابهار و سواحل آن گونه‌های متعدد جلبک وجود دارد که خواص ضداکسیدان برخی از آن‌ها هرگز مورد مطالعه قرار نگرفته است. فقدان اطلاعات کافی در زمینه خواص ضداکسیدان جلبک‌های این منطقه سبب انجام این مطالعه شد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان جلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinodis* جمع‌آوری شده از خلیج چابهار است. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند به عنوان مقدمه‌ای برای انجام مطالعات پیش‌کلینیکی و کلینیکی جهت یافتن داروهایی با خواص ضداکسیدان بیانجامد.

روش بررسی

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی از نوع برون سلولی بود. عملیات نمونه‌برداری از جلبک دریایی *Cystoseira trinodis* در خلیج چابهار واقع در استان سیستان و بلوچستان از ایستگاه پلاژ تیس ($25^\circ 17' 71'' N$ ، $60^\circ 37' 17'' E$) در فصل پاییز و اوایل زمستان سال ۱۳۹۳ و در زمان بیشینه جذر صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری با آب دریا شستشو داده شدند و درون کیسه‌های پلاستیکی حاوی آب دریا و برچسب مشخصات و تاریخ نمونه‌برداری به آزمایشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل شدند؛ سپس مجدد با آب شیرین شستشو داده شدند تا شن و ماسه، اپی‌فیت‌ها و سایر موجودات چسبیده به آن‌ها جدا شود. مقداری از جلبک‌ها جهت شناسایی و تأیید گونه نگهداری شد. پس از آن جلبک‌ها در سایه خشک شده تا زمانی که به وزن ثابتی برسند و سپس توسط آسیاب برقی پودر شدند. نمونه‌های پودر شده تا زمان مصرف درون فریزر در دمای $-20^\circ C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمای کلی جلبک *Cystoseira trinodis* در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: جلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinodis* جمع‌آوری شده از سواحل چابهار

عصاره‌گیری و استخراج:

استخراج عصاره‌ها از طریق خیساندن پودر خشک شده جلبک (۲۵ گرم) در حلال‌های متانول، کلروفرم، اتیل استات و آن-هگزان (حجم ۸۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) انجام شد. سپس نمونه‌ها درون شیکر انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای محیط قرار گرفتند. پروسه استخراج دو بار دیگر تکرار شد و پس از آن عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شدند؛ عمل حلال‌پرانی در زیر هود انجام گرفت و عصاره‌ها تغلیظ شده و برای مصارف بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۴).

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مورد نظر با استفاده از سه روش حذف رادیکال آزاد (DPPH)، فعالیت کلاته کردن یون فلزی (Metal chelating activity) و قدرت کاهش (Reduction power) صورت گرفت. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH):

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس توانایی به دام اندازی رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH) طبق روش Blois در سال ۱۹۵۸ انجام گرفت (۱۵). به طور خلاصه ۱/۵ میلی‌لیتر محلول متانولی رادیکال آزاد DPPH به ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره (در غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزوده و یک دقیقه به صورت

دوار تکان داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شد و جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH) عصاره طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\% \text{ فعالیت مهار رادیکال آزاد} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

A_{sample} جذب نمونه بعد از زمان مورد نظر و A_{control} جذب محلول DPPH و فاقد نمونه است. اسید آسکوربیک (۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به عنوان نمونه استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت کلاته‌کنندگی یون آهن (Ferrous ion chelating activity):

کلاته‌کنندگی یون آهن توسط عصاره‌ها بر اساس روش Dinis و همکاران (۱۶) مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه ۰/۰۱ میلی‌لیتر FeCl_2 به ۳/۷ میلی‌لیتر از نمونه حاوی عصاره (با غلظت‌های ذکر شده در بالا) افزوده شد و به مدت ۳ دقیقه صبر نمودیم. سپس واکنش با اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین شروع شد. پس از آن محلول را به شدت تکان داده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دادیم. در نهایت میزان جذب محلول در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت شد. درصد مهار کمپلکس ferrozine- Fe_2^+ تشکیل شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$[100 \times (A_0 - A_1) / A_0] = \text{درصد مهار}$$

در این فرمول A_0 جذب کنترل و A_1 جذب عصاره‌ها / استاندارد را نشان می‌دهد. گروه کنترل حاوی FeCl_2 و ferrozine و آب مقطر است. EDTA به عنوان نمونه استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

قدرت کاهش (Reduction power):

تعیین قدرت کاهش عصاره‌ها بر اساس روش Oyaizu (۱۷) صورت گرفت. به این صورت که ۱ میلی‌لیتر از عصاره مورد نظر در غلظت‌های مختلف با ۱ میلی‌لیتر فسفات بافر (۰/۲ مولار، pH=۶/۶) و ۱ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۰/۱) ترکیب شد. مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون، ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰٪ TCA) به محلول اضافه شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته شده و با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد و ۰/۴ میلی‌لیتر محلول FeCl_3 (۰/۱٪) به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در محیط اتاق قرار گرفت. در نهایت میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. میزان جذب بالاتر نشان‌دهنده قدرت کاهش بالاتر است. اسید آسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد.

در این مطالعه از آزمون One Way ANOVA جهت بررسی داده‌ها استفاده شد. مقایسه میانگین با آزمون TUKEY در

سطح احتمال ۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار Graphpad-Prism 6 انجام شد. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار تأیید و تصویب شده است (۹۵۰۰۰۰۲).

نتایج

ظرفیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های مختلف نمونه‌های جلبک *Cystoseira trinodis* با استفاده از سه روش DPPH، قدرت احیاکنندگی و خاصیت کلاته‌کنندگی یون آهن و در غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۱ - ۰/۰۰۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج زیر حاصل شد:

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH):

بر اساس داده‌های حاصل از سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مورد عصاره‌های مختلف جلبک *Cystoseira trinodis* بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH مربوط به عصاره اتیل استاتی با ۰/۹۲٪ مهار در غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بود و پس از آن عصاره ان-هگزانی و متانولی با ۰/۸۲/۵۵٪ و ۰/۶۲/۴۸٪ مهار قرار گرفتند. در مورد عصاره کلروفومی این جلبک، با افزایش غلظت عصاره از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، درصد مهار کاهش یافت (جدول ۱). در این تست، اسید آسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و درصد مهار آن در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۰/۹۴/۴۶٪ گزارش شد که نسبت به تمام عصاره‌های مورد مطالعه بیشتر بود.

جدول ۱- نتایج بررسی اثر مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های مختلف جلبک *Cystoseira trinodis* در غلظت‌های مختلف

غلظت	عصاره (mg/ml)	متانول	کلروفوم	اتیل استات	ان-هگزان
۱	۶۲/۴۸ ± ۷/۶۷ ^g	۶۱/۶۸ ± ۴/۹۲ ^{bg}	۹۲ ± ۴/۹۶ ^{ae}	۸۲/۵۵ ± ۷/۶۴ ^{af}	
۰/۵	---	۸۰/۳۴ ± ۳/۵۵ ^{ae}	۸۵/۷۱ ± ۶/۱۸ ^{ae}	۴۲/۷۹ ± ۲/۴۷ ^{bf}	
۰/۱	---	---	۱۰/۷۱ ± ۳/۲۷ ^b	---	
۰/۰۱	---	---	---	---	
۰/۰۰۱	---	---	---	---	

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است. اختلاف آماری در هر ستون با حروف a, b و c و در هر ردیف با حروف e, f و g گزارش شده است. معنی‌داری در سطح اطمینان ۰/۰۵ است.

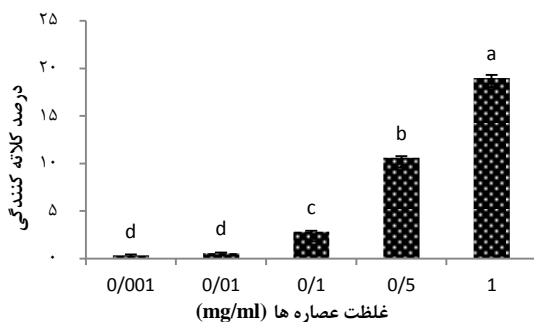
فعالیت کلاته‌کنندگی تمامی عصاره‌های جلبک *Cystoseira trinodis* اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مورد آزمون نشان داد و بر اساس پس‌آزمون TUKEY، تمامی عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری را با استاندارد نشان دادند ($p < 0.05$). غلظت ۱ تمامی عصاره‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها، فعالیت کلاته‌کنندگی بالاتری را نشان داد ($p < 0.05$). در مورد عصاره‌های متانولی و کلروفومی این جلبک، غلظت‌های کمتر یا مساوی ۰/۱ و در مورد عصاره ان-هگزان، غلظت‌های کمتر یا مساوی ۰/۱ فاقد اختلاف معنی‌داری بودند ($p > 0.05$).

در این تست EDTA به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و حداکثر فعالیت کلاته‌کنندگی آن ۸۲/۱۹٪ گزارش شد. در تمامی عصاره‌های حاصل از این جلبک، رابطه مستقیم بین غلظت عصاره‌ها و درصد کلاته‌کنندگی یون آهن مشاهده شد. نمودارهای ۱ تا ۴ درصد کلاته‌کنندگی یون آهن توسط عصاره‌های حاصل از جلبک *Cystoseira trinodis* را نشان می‌دهند.

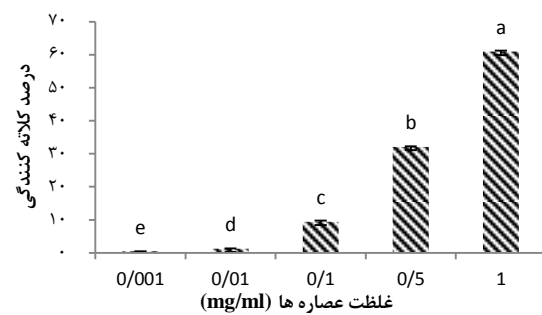
نتایج آنالیز آماری جلبک *Cystoseira trinodis* نشان داد که بین عصاره اتیل استاتی با ان-هگزانی، متانولی و کلروفومی در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0.05$)، اما بین عصاره متانولی و کلروفومی اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p > 0.05$). در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز بین کلروفوم و اتیل استات اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$)، اما با عصاره ان-هگزانی اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p < 0.05$).

فعالیت کلاته‌کنندگی یون آهن (Ferrous ion chelating activity)

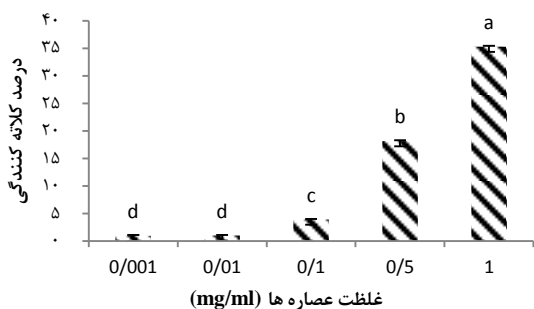
بر اساس داده‌های حاصل از سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از تست فعالیت کلاته‌کنندگی یون آهن در مورد عصاره‌های مختلف جلبک *Cystoseira trinodis* بالاترین درصد کلاته‌کنندگی مربوط به عصاره اتیل استاتی با ۶۰/۹۲٪ کلاته‌کنندگی (در غلظت ۱ mg/ml و $IC_{50} = 4/92$) و پایین‌ترین درصد کلاته‌کنندگی برای عصاره ان-هگزانی با ۸/۷۵ mg/ml ($IC_{50} = 26/15$) گزارش شد. آزمون ANOVA



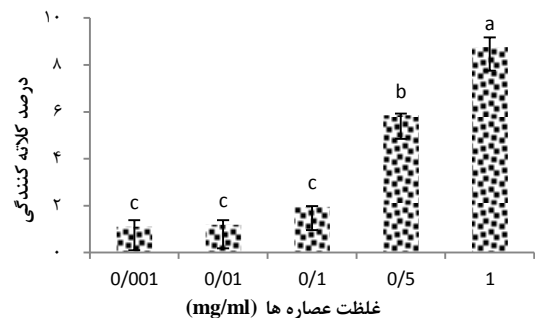
نمودار ۲: درصد کلاته‌کنندگی یون آهن عصاره متانولی جلبک *C. trinodis*



نمودار ۱: درصد کلاته‌کنندگی یون آهن عصاره اتیل جلبک *C. trinodis*



نمودار ۴: درصد کلاته‌کنندگی یون آهن عصاره کلروفومی جلبک *C. trinodis*

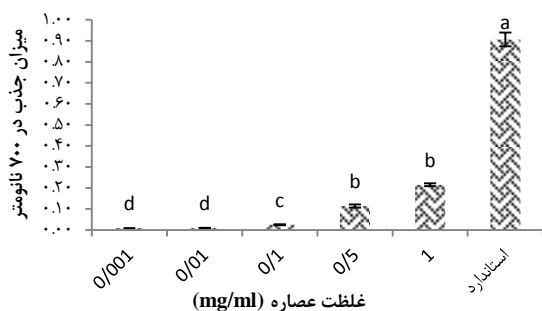


نمودار ۳: درصد کلاته‌کنندگی یون آهن عصاره ان-هگزانی جلبک *C. trinodis*

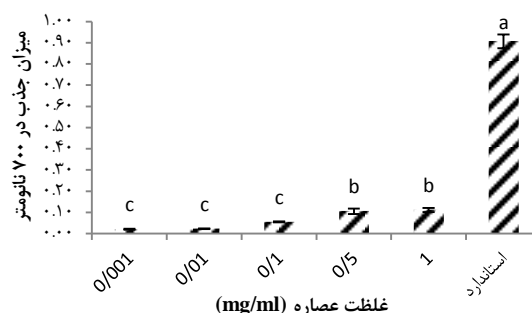
ان- هگزانی غلظت‌های کمتر یا مساوی ۰/۱ و در مورد عصاره متانولی و کلروفرمی غلظت‌های کمتر یا مساوی ۰/۰۱ فاقد اختلاف معنی‌داری بودند ($p > 0.05$). آزمون ANOVA در مورد عصاره اتیل استاتی این جلبک فاقد اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ بود ($p > 0.05$). در تمامی عصاره‌های حاصل از جلبک مورد مطالعه، با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان جذب نمونه‌ها و در نتیجه قدرت احیاء کنندگی آن‌ها افزایش یافت. در این تست، اسید آسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و میزان جذب آن در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۰/۹۰۶ گزارش شد که قدرت احیاء کنندگی آن نسبت به تمام عصاره‌های مورد مطالعه بیشتر بود. نمودارهای ۵ الی ۸ قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های حاصل از جلبک *Cystoseira trinodis* و مقایسه آن‌ها با نمونه استاندارد را نشان می‌دهند.

فعالیت احیاء کنندگی (Reduction power):

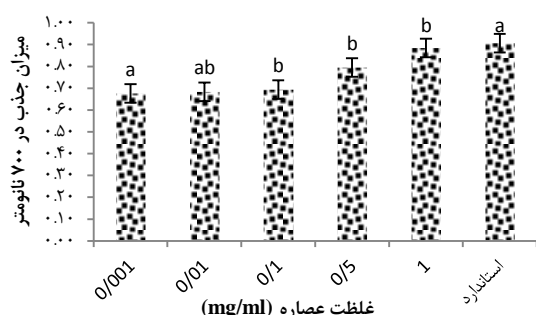
بر اساس داده‌های حاصل از سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از تست قدرت احیاء کنندگی در مورد عصاره‌های مختلف جلبک *Cystoseira trinodis* بالاترین میزان احیاء کنندگی مربوط به عصاره کلروفرمی با لاندای جذب ۰/۸۸۵ و پایین‌ترین جذب برای عصاره ان- هگزانی با مقدار ۰/۱۱۱ در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد. آزمون ANOVA فعالیت احیاء کنندگی عصاره‌های متانولی و اتیل استاتی جلبک *Cystoseira trinodis* اختلاف معنی‌دار در تیمارهای مورد آزمون نشان داد و بر اساس پس‌آزمون TUKEY، تمامی تیمارها با استاندارد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$). غلظت ۱ عصاره اتیل استاتی، قدرت کاهش‌ی بالاتری را نشان داد ($p < 0.05$). بین غلظت ۱ و ۰/۵ عصاره‌های متانولی و ان- هگزانی و همچنین بین چهار غلظت بالاتر عصاره کلروفرمی، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و در مورد عصاره



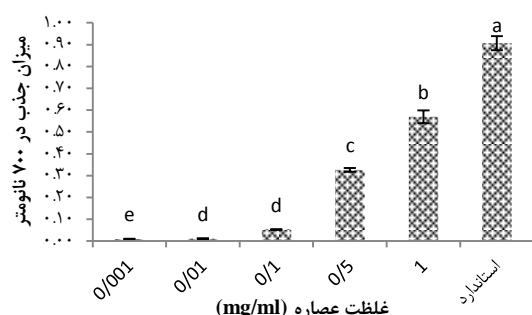
نمودار ۶: قدرت کاهش‌ی عصاره متانولی جلبک *C. trinodis* و نمونه استاندارد (اسید آسکوربیک)



نمودار ۵: قدرت کاهش‌ی عصاره ان- هگزانی جلبک *C. trinodis* و نمونه استاندارد (اسید آسکوربیک)



نمودار ۸: قدرت کاهش‌ی عصاره کلروفرمی جلبک *C. trinodis* و نمونه استاندارد (اسید آسکوربیک)



نمودار ۷: قدرت کاهش‌ی عصاره اتیل استاتی جلبک *C. trinodis* و نمونه استاندارد (اسید آسکوربیک)

بحث

دمای بالا و اشعه زیاد خورشید در عرض‌های پایین جغرافیایی سبب می‌شود که گیاهان این مناطق برای مقابله با اشعه‌های ماوراءبنفش و رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری تولید کنند؛ چراکه مطالعات قبل نشان داده است که اشعه UV موجب ارتقاء دفاع آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌ها می‌شود (۱۸). دریای عمان نیز در عرض‌های جغرافیایی پایین قرار گرفته و دارای گونه‌های جلبکی متنوعی است. یک گروه از این جلبک‌ها خانواده سیستوسورا است که دارای پراکنش وسیعی در استان‌های هرمزگان (بستانه، بندرلنگه و برکه سفلین) و سیستان و بلوچستان و کم‌وبیش در تمامی فصول می‌باشد. در مطالعه حاضر، به دلیل استفاده از عصاره تام نمونه‌های جلبک، روش‌های متفاوتی جهت بررسی خواص آنتی‌اکسیدان آن‌ها بکار گرفته شد. گزارش‌های متعددی وجود دارد که بر استفاده از چندین آزمایش آنتی‌اکسیدانی برای سنجش ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی یک عصاره تأکید نموده‌اند، زیرا ممکن است یک آزمایش به‌تنهایی نتواند منعکس‌کننده قدرت آنتی‌اکسیدانی یک ماده بوده و در شرایط مختلف، نتایج مشابهی از نمونه را در اختیار قرار ندهد (۱۹).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH):

سنجش فعالیت مهار رادیکال DPPH به‌طور گسترده‌ای جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا می‌تواند نمونه‌های بسیاری را در مدت‌زمانی کوتاه مورد ارزیابی قرار داده و به اندازه کافی حساس است و می‌تواند ترکیبات فعال را در غلظت‌های پایین تشخیص دهد (۲۰). کاهش در جذب رادیکال DPPH ناشی از حضور آنتی‌اکسیدان‌ها، به دلیل مهار این رادیکال توسط هیدروژن اهدایی است که به صورت تغییر رنگی قابل توجه از بنفش به زرد نمایان می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از این تست، بالاترین فعالیت مهار رادیکال آزاد در عصاره اتیل استاتی با ۹۲٪ مهار دیده می‌شود، با این حال عصاره ان-هگزانی و متانولی نیز مهار خوبی از خود نشان دادند. این مسئله با نتایج حاصل از تحقیق Ganesan و همکاران مطابقت دارد که نشان داد فراکسیون اتیل استاتی عصاره جلبک قرمز

Acanthophora spicifera فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به سایر فراکسیون‌ها دارا بود (۲۱). در مورد عصاره کلروفومی این جلبک، با افزایش غلظت از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، درصد مهار رادیکال آزاد کاهش یافت و هر ۳ تکرار این نکته را نشان داد که می‌تواند نشان‌دهنده وجود یک نقطه بهینه است و بیانگر آن است که درصد مهار رادیکال DPPH در مورد این عصاره وابسته به غلظت نبوده و می‌تواند روی بهینه سازی غلظت‌های مورد آزمایش، تحقیقات بیشتری را انجام داد.

به طور کلی در غلظت‌های بالاتر به دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان بیشتر از جمله ترکیبات فنولی بیشتر و در نتیجه افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (۲۰). در این تست، اسید آسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و درصد مهار آن در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۹۴/۴۶٪ گزارش شد که نسبت به تمامی عصاره‌های مورد مطالعه بیشتر بود.

فعالیت کلاته‌کنندگی یون آهن (Ferrous ion chelating activity):

عوامل کلاته‌کننده به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه هستند، زیرا می‌توانند پتانسیل احیا را کاهش داده و باعث پایداری فرم اکسید شده یون فلزی شوند (۲۲). یون‌های فلزی واسطه دو ظرفیتی، نقش مهمی را به عنوان کاتالیزور فرایندهای اکسیداتیو بازی می‌کنند و همین‌طور منجر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و واکنش‌های تجزیه هیدروژن پراکسید از طریق شیمی فنتون می‌شوند (۲۳). شناساگر این واکنش فروزین نام دارد که با آهن II موجود در محیط، کمپلکس قرمزرنگی به صورت $Fe (Ferrozine)_3^{4-}$ تشکیل می‌دهد. غلظت آهن محیط در حضور عوامل کلاته‌کننده کاهش می‌یابد و رنگ قرمز کمپلکس آهن-فروزین کم می‌شود. بر اساس نتایج حاصل، عصاره اتیل‌استاتی جلبک *Cystoseira trinodis* دارای بهترین فعالیت کلاته‌کنندگی به

دارای فعالیت احیاءکنندگی قابل ملاحظه‌ای بودند، به طوری که حتی غلظت‌های پایین این جلبک (غلظت‌های ۰/۰۱ mg/ml و ۰/۰۱) اختلاف معنی‌داری را با نمونه استاندارد نشان ندادند (p>۰/۰۵). با توجه به اینکه این نتایج بر اساس سه تکرار آزمایش به دست آمده است، می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که عصاره کلروفرمی این جلبک حاوی ترکیب و یا ترکیباتی است که می‌توانند در حداقل ممکن، دارای حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشند. در مطالعه Supardy و همکاران در سال ۲۰۱۱، فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های مختلف جلبک *Halimeda discoidea* با استفاده از روش DPPH مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره کلروفرمی این جلبک دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بالاترین محتوای فنولی است (۲۸) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

به طور کلی خاصیت احیاءکنندگی با حضور عوامل احیاءکننده مرتبط است (۲۹). Gordon در سال ۱۹۹۰ گزارش کرد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاءکننده‌ها بر پایه شکستن زنجیره رادیکال‌های آزاد به وسیله اهدای اتم هیدروژن است. همچنین احیاءکننده‌ها با پیش سازهای خاصی از رادیکال پراکسید واکنش می‌دهند و به این طریق از تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند (۲۲). جذب اسید آسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد (در غلظت ۰/۰۲ mg/ml) به میزان ۰/۹۰۶ بود که نسبت به تمامی عصاره‌ها بالاتر بود و دارای بیشترین قدرت احیاءکنندگی یون آهن است.

Zubia و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تحقیق خود بر روی ۴۸ گونه جلبک دریایی، بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی را برای جلبک‌های قهوه‌ای ثبت کرد که این نتایج با نتایج مطالعه اخیر همپوشانی دارد (۳۰). Sellimi و همکاران در سال ۲۰۱۴ ترکیبات جلبک قهوه‌ای *Cystoseira barbata* را شناسایی کردند و موفق به استخراج ترکیبات فوکان از این جلبک شدند. این ترکیب پلی ساکاریدی نوعی گالاکتوفوکان سولفات بوده که عمدتاً حاوی L- α - فوکوپیرانوز (۴۴/۶٪) و D- β - گالاکتوپیرانوز (۳۴/۳۲٪) می‌باشد. همچنین قندهای گلوکوز، رامنوز، زایلوز و مانوز نیز به مقدار کم در این جلبک یافت شدند. عصاره فوکان

میزان ۶۰/۹۲٪ و کمترین میزان مربوط به عصاره ان-هگزانی با ۸/۷۵٪ (IC₅₀=۲۶/۱۵) فعالیت کلاته‌کنندگی بود. در مطالعه Karawita و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز خواص آنتی‌اکسیدان عصاره‌های مختلف جلبک *Hizikia fusiformis* با استفاده از روش‌های مختلف از جمله روش کلاته‌کنندگی یون آهن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های اتیل استاتی و کلروفرمی این جلبک به‌طور قابل ملاحظه‌ای دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بودند که با نتایج تحقیق حاضر، مشابهت دارد (۲۴). در این مطالعه، عصاره ان-هگزانی این جلبک دارای کمترین فعالیت کلاته‌کنندگی بود. عصاره‌ای که توسط حلال هگزان استخراج می‌شود، اغلب حاوی ترکیبات غیر قطبی است (۲۵). با توجه به اینکه عصاره ان-هگزانی در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی خوبی را در تست فعالیت کلاته‌کنندگی از خود نشان نداد، می‌توان گفت که ترکیبات غیر قطبی موجود در این ماکروجلبک، فاقد قدرت کلاته‌کنندگی مناسبی است. فعالیت کلاته‌کنندگی EDTA به عنوان نمونه استاندارد (در غلظت ۰/۱ mg/ml) بین ۵۲/۵۱٪ تا ۸۲/۱۹٪ متغیر بود و حداکثر فعالیت کلاته‌کنندگی آن نسبت به تمامی عصاره‌ها بالاتر بود.

فعالیت احیاءکنندگی (Reduction power):

قدرت احیاءکنندگی یک ترکیب می‌تواند شاخص خوبی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن محسوب شود (۲۶). در این روش کاهش، حضور عوامل احیاءکننده در محلول واکنش سبب کاهش کمپلکس ferricyanide / Fe³⁺ و تبدیل آن به فرم ferrous می‌شود؛ بنابراین Fe²⁺ می‌تواند با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر مورد پایش قرار گیرد (۲۷). داده‌های موجود در این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلروفرمی جلبک *Cystoseira trinodis* در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۰/۸۸۵ بود که بیش از سایر عصاره‌ها بود و پس از آن عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی با جذب ۰/۵۶۹ و ۰/۲۱۵ در رده‌های بعدی قرار گرفتند. کمترین میزان جذب نیز مربوط به عصاره ان-هگزانی به میزان ۰/۱۱۱ بود. تمامی غلظت‌های مربوط به عصاره کلروفرمی این جلبک

Cystoseira trinodis در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر داد. این نتایج نشان از قابلیت استفاده احتمالی آن‌ها در علوم پزشکی و داروسازی پس از انجام مطالعات دقیق‌تر دارد. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند به‌عنوان مقدمه‌ای برای انجام مطالعات پیش‌کلینیکی و کلینیکی جهت یافتن داروهایی با خواص ضدسرطان و ضداکسیدان بیانجامد که نیاز است تا ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر در عصاره‌های استخراجی مورد شناسایی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به جهت حمایت مادی و معنوی از انجام این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

حاوی مقادیر قابل‌توجهی از گروه‌های سولفات و استیل بود. نتایج تحقیق آنان نشان داد که پلی‌ساکاریدهای سولفات مستخرج از جلبک *C. barbata* دارای خواص آنتی‌اکسیدان بسیار خوبی از طریق مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت از جمله کلاته‌کنندگی یون آهن، اهداء هیدروژن و یا الکترون و مهار رادیکال‌ها در فرآیند پراکسیداسیون بود. بایستی خاطر نشان کرد که خواص آنتی‌اکسیدان قابل‌ملاحظه این جلبک ممکن است به دلیل حضور ترکیبات سولفات و یا گروه‌های استیلی در آن باشد (۳۱).

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان از اثرات بسیار خوب آنتی‌اکسیدانی ترکیبات اتیل استاتی و کلروفرمی استخراجی از جلبک

References:

- 1- Song H, Zhang Q, Zhang Z, Wang J. *In vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from Bryopsis plumose*. Carbohydr Polym 2010; 80: 1057–61.
- 2- O'Sullivan AM, O'Callaghan YC, O'Grady MN, Queguineur B, Hanniffy D. et al. *In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland*. Food Chem 2011; 126: 1064–70.
- 3- Sherwin ER. *Antioxidants. In: Food Additives*. Branen R. (ed.), New York: Marcel Dekker; 1990. P 139–193.
- 4- Grice HC. *Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract*. Food Chem Toxicol 1986; 24(10-11): 1127–30.
- 5- Grice HC. *Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium*. Food Chem Toxicol 1988; 26(8): 717–23.
- 6- Hettiarachchy NS, Glenn KC, Gnanasambandam R, et al. *Natural antioxidant extract from fenugreek (Trigonella foenumgraecum) for ground beef patties*. J Food Sci 1996; 61: 516–19.
- 7- Huang HL, & Wang BG. *Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the qingdao coastline*. J Agri Food Chem 2004; 52: 4993–97.
- 8- Wijesekara I, Pangestuti R., Ki SK. *Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae*. Carbohydr Polym 2011; 84: 14–21.
- 9- Miyashita K, Takagi T. *Tocopherol content of Japanese algae and its seasonal variation*. Agric Biol Chem

- 1987; 51: 3115–18.
- 10- Hosokawa M, Okada T, Mikami N, Konishi I, Miyashita K. *Bio-functions of marine carotenoids*. Food Sci Biotechnol 2009; 18(1): 1–11.
- 11- Parys S, Rosenbaum A, Kehraus S, Reher G, Glombitza KW, Konig GM. *Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts*. J Nat Product 2007; 70(12): 1865–70.
- 12- Suresh V, Kumar NS, Murugan P, Palani P, Rengasamy R, & Anbazhagan C. *Antioxidant properties of sequential extracts from brown seaweed, Sargassum plagiophyllum, C. Agardh*. Asian Pacific J Trop Disease; 2012; 937-39.
- 13- Sohrabipour J, Rabiei R. *Morphology and anatomy of Gracilariopsis longissima in the Persian Gulf, (Iranian coast lines)*. Pazhuhesh and Sazandegi Natural Resources 2008; 20(4): 2-8. [persian]
- 14- Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO. *Evaluation of antioxidative activity of extracts from brown seaweed, Sargassum siliquastrum*. J Agric Food Chem 2002; 50(13): 3862–66.
- 15- Blois MS. *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Nature 1958; 26: 1199–1200.
- 16- Dinis T, Madeira V, & Almeida L. *Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers*. Archive Biochem Biophysic 1994; 315: 161-9.
- 17- Oyaizu M. *Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine*. Japan J Nutri 1986; 44(6): 307-15.
- 18- Lopez A, Rico M, Rivero A, & Tangil D M. *The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of Stypocaulon scoparium algae extracts*. Food Chem 2011; 125: 1104-9.
- 19- Blanc N, Hauchard D, Audibert L, & Ar Gall E. *Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed Ascophyllum nodosum. An electrochemical approach*. Talanta 2011; 84: 518-513.
- 20- Sanchez-Moreno C. *Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*. Food Sci Technol Inter 2002; 8: 121-37.
- 21- Ganesan P, Chandini S, Kumar N, Bhaskar N. *Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds*. Bioresource Technol 2008; 99: 2717-23.
- 22- Gordon MH. *The mechanism of antioxidant action in vitro*. In: B. J. F. Hudson, Ed., Food Antioxidants, Elsevier Applied Science 1990; 1-18.
- 23- Halliwell B. *Antioxidants: the basics- what they are and how to evaluate them*. Advance pharmacol 1996; 38: 3-20.
- 24- Karawita R, Siriwardhana N, Lee KW, Heo MS, Yeo IK, Lee YD, et al. *Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from Hizikia fusiformis*. Eur Food Res Technol 2005; 220; 363-71.

- 25- Andersen ØM, Markham KR. *Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications*. London, New York, Boca Raton: Taylor & Francis 2006: 397-441.
- 26- Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph-Hadas S. *Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves*. J Agric Food Chem 1995; 43(7): 1813-19.
- 27- Zou YP, Lu YH, & Wei DZ. *Antioxidant activity of a flavonoid rich extract of Hypericum perforatum L. in vitro*. J Agric Food Chem 2004; 52(16): 5032-39.
- 28- Supardy NA, Ibrahim D, Sulaiman SF, & Zakaria NA. *Free radical scavenging activity, total phenolic content and toxicity level of Halimeda discoidea (Decaisne) extracts (Malaysia's green macroalgae)*. Int J Pharmacy Pharmaceutic Sci 2011; 3(5): 397-402.
- 29- Pin-Der D. *Antioxidant activity of Budrock (Arctium lappa Linn): Its scavenging effect on free radical and active oxygen*. J Am Oil Chem Soci 1998; 75: 455-61.
- 30- Zubia M, Robledo D, & Freile-Pelegrin Y. *Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico*. J Appl Phycol 2007; 19: 449-58.
- 31- Sellimi S, Kadri N, Barragan-Montero V, Laouer H, Hajji M, & Nasri M. *Fucans from a Tunisian brown seaweed Cystoseira barbata: Structural characteristics and antioxidant activity*. Int J Biol Macromolecul 2014; 66: 281-88.
- 32- Lordan S, Ross RP, & Stanton C. *Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases*. Mar Drugs 2011; 9(6): 1056-100.

Study the Antioxiative Properties of the Marine Algae *Cystoseira trinodis* extracts from Chabahar Coastal Water

Ali Taheri^{*1}, Mostafa Ghaffari², Narges Sadat Bagherpour³, Gilan Attaran Fariman⁴

¹⁻³ Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

⁴ Marine Biology Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Received: 5 Jan 2017

Accepted: 18 May 2017

Abstract

Introduction: Marine macro algae used in pharmaceutical, medical, food, cosmetics and health. Bioactive compounds in seaweeds have widespread the effects of antibacterial, antitumor, antifungal, antioxidant and anticancer. In this study, the antioxidant properties of the extracts of *Cystoseira trinodis* collected from the Chabahar Bay were studied.

Methods: In this experimental study, methanol, chloroform, ethyl acetate and n-hexane extracts of *Cystoseira trinodis* were prepared. To evaluate the antioxidant properties of algal extracts, the methods of free radical scavenging DPPH, metal chelating activity and ferric reducing activity were used. One way ANOVA and Tukey Posthoc tests were used as statistical analysis by Graphpad-Prism 6 software.

Results: The results showed that the highest antioxidant capacity based on the DPPH test for *C. trinodis* were respectively for ethyl acetate extract (92±4.96% inhibition), in metal ions chelating activity test, the findings were 60.92±0.31% for the ethyl acetate extract, and in ferric reducing activity test, and the chloroform extract absorbance was 0.885±0.03 in 1 mg/ml concentration.

Conclusion: This study shows that the different algal extracts of *C. trinodis* has antioxidant properties with varying degrees and effective use of this compound as a therapeutic tool can be programmed. Further research on the purification and extraction of the constituents of the extract and identification the most effective combination should be conducted.

Keywords: Antioxidants, Marine Algae, Free radicals, Chabahar Bay, *Cystoseira trinodis*

This paper should be cited as:

Taheri A, Ghaffari M, Bagherpour NS, Attaran Fariman G. **Study the Antioxiative Properties of the Marine Algae *Cystoseira trinodis* extracts from Chabahar Coastal Water.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(8): 658-69.

*Corresponding author: Tel: +98 5431272095, email: taherienator@gmail.com