بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد دوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۲
http://japu.gau.ac.ir

میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک قرمز (*Hypnea hamulosa*) خلیج فارس

الهام گرمسیری[۱]، *مسعود رضایی[۲]، امیررضا شویکلو[۳] و آریا باباخانی لشکان[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، [۲]استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، [۳]استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، [۴]استادیار گروه شیلات، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۸

چکیده

در این پژوهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک قرمز (*Hypnea hamulosa*) با استفاده از آزمایش‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل سنجیده شد. استخراج عصاره از نمونه‌ها با نسبت ۱ :۲۰ (حلال به جلبک) به روش غوطه‌وری به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق (۲۸-٢٦ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. حلال‌های مورد استفاده شامل آب مقطر (۱۰۰ درصد) و حلال‌های آلی (شامل استون، متانول و اتانول) در سطوح ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد بود. نتایج نشان داد عصاره استونی ۵۰ درصد دارای بیشترین مقادیر فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی کل به‌ترتیب با مقادیر ۰/۲۷، ۰/۰٦ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی، ٦۹/۹۸ (RSA درصد) و ۰/۰۷ میلی‌گرم اسیداسکوربیک بر گرم پودر جلبکی خشک شده بود. براساس نتایج این پژوهش جلبک قرمز می‌تواند گونه مناسبی برای استخراج ترکیبات فنولی به‌شمار آید و تفاوت‌های موجود در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با نسبت‌های حلالی مختلف ممکن است در ارتباط با درجه قطبیت حلال‌ها و خواص بیوشیمیایی این جلبک باشد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قدرت کاهندگی آهن، *Hypnea hamulosa*

* مسئول مکاتبه: rezai_ma@modares.ac.ir

مقدمه

انواع مختلفی از مشتقات اکسیژنی مانند رادیکال‌های آنیونی سوپراکسید، یون اکسیژن و عامل هیدروکسیل همراه با پراکسیدها و فلزات واسطه در طول زندگی موجودات تولید می‌شوند. این متابولیت‌ها اثرات مخربی بر سلول‌های زنده، DNA و غشاهای سلولی دارند (راستین و همکاران، ۲۰۰۷) این ترکیبات از دلایل اصلی فساد مواد خوراکی هستند و با اکسایش چربی‌ها باعث تندی، مسمومیت و دیگر آثار مخرب در سایر مولکول‌های زیستی موجود در مواد خوراکی می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها راهکاری مؤثر برای کاهش اکسایش چربی در فرآورده‌های غذایی می‌باشند (روبرت و همکاران، ۲۰۰۱). این ترکیبات قادرند اکسایش ماده اکسید شونده را مهار کنند و یا آن را به تأخیر اندازند (پازوس و همکاران، ۲۰۰۵). از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی رایج در صنایع غذایی، بوتیل هیدروکسی تولوئن[1]، بوتیل هیدروکسی آنیزول[2] و ترت بوتیل هیدروکینون[3] می‌باشند (سوزا و همکاران، ۲۰۰۱).

با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی بر سلامتی انسان مانند جهش‌زایی، ایجاد مسمومیّت و سرطان‌زایی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که اثر محافظتی در برابر بیماری‌های مزمن، سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی و عروقی، آلزایمر، آب مروارید و جهش‌زایی دارند، توصیه شده است (ساکاناکا و همکاران، ۲۰۰۵).

بسیاری از پژوهشگران وجود انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌ها را در گونه‌های مختلف گیاهان عالی گزارش کرده‌اند (یوان و همکاران، ۲۰۰۶؛ سوزا و همکاران، ۲۰۱۱). توکوفرول‌ها، فسفولیپیدها، اسید اسکوربیک و استرهای آن‌ها، رزین‌های رزماری، صمغ‌های مریم گلی و عصاره‌های برگ چای، برخی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناسایی شده، می‌باشند. همچنین بسیاری از منابع دریایی و گیاهان آبزی به‌منظور یافتن ترکیبات زیست فعال جهت ساخت داروهای جدید و مواد خوراکی فراسودمند، مورد توجه قرار گرفته است. جلبک‌های دریایی گزینه‌ای عالی برای چنین ترکیباتی هستند و به‌عنوان یکی از غنی‌ترین منابع متابولیت‌های زیست فعال مورد بررسی قرار گرفته‌اند (ناهاس و همکاران، ۲۰۰۷؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). جلبک‌های دریایی منابع تجدیدپذیری هستند که در محیط‌های دریایی وجود دارند. جلبک‌های دریایی دارای ویژگی‌های بیولوژیکی مثل خواص آنتی‌باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌ویروسی

1- Butylated hydrozytoluene
2- Butylated hydroxyanisole
3- Tert butylhydroquinone

و ضدقارچی می‌باشند در میان ترکیباتی که در جلبک‌ها یافت شده‌اند، آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (پلازا و همکاران، ۲۰۰۸). جلبک‌های دریایی همانند دیگر گیاهان فتوسنتز کننده، در معرض نور شدید و غلظت بالای اکسیژن قرار می‌گیرند که این عوامل، تشکیل رادیکال‌های آزاد و دیگر عوامل اکسید کننده را تحریک می‌کنند. عدم وجود خسارات اکسیداتیو در ترکیبات ساختاری آن‌ها (به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع)، مقاومت و ثبات در طول نگهداری موید این نکته است که سلول‌های آن‌ها دارای سیستم‌های حفاظتی در برابر اکسایش هستند (ناهاس و همکاران، ۲۰۰۷). دمای بالا و تشعشعات بالای خورشیدی در عرض‌های جغرافیایی پایین سبب می‌شود که گیاهان این مناطق برای مقابله با اشعه‌های ماورای بنفش و رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری تولید کنند (لوپز و همکاران، ۲۰۱۱). خلیج‌فارس نیز در عرض‌های پایین قرار دارد و دارای گونه‌های جلبکی متنوعی می‌باشد. یک گروه از این جلبک‌ها خانواده Hypneacae می‌باشد که به وفور در خلیج‌فارس وجود دارد و استفاده کاربردی از آن نمی‌شود. از این رو به‌دلیل ویژگی‌های چندکاربردی عصاره‌های جلبکی، استخراج آن‌ها می‌تواند به‌عنوان منبع آنتی‌اکسیداسیونی طبیعی مورد توجه قرار گیرند (چیو و همکاران، ۲۰۰۸؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). هدف از انجام این پژوهش بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک قرمز (*H. hamulosa*) خلیج‌فارس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: جلبک قرمز *H. hamulosa* از سواحل خلیج فارس در منطقه ساحل جنوبی شهر بوشهر جمع‌آوری و با آب دریا شستشو شدند تا باقی‌مانده اپی‌فیت‌ها، شن و ماسه و نمک از جلبک‌ها جدا شود. سپس نمونه‌ها با آب شیرین شستشو شدند و در دمای محیط و در سایه به‌مدت ۳ تا ٤ روز قرار گرفتند تا خشک شوند. نمونه‌ها بعد از خشک شدن، به آزمایشگاه فرآوری دانشکده منابع‌طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند و در یک دستگاه خردکن (Mulinex, La Molinett، فرانسه) به‌صورت پودر درآمدند و تا زمان انجام آزمایش در کیسه‌های پلاستیکی درب‌دار و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

عصاره‌گیری: پنج گرم نمونه پودر شده به ۱۰۰ میلی‌لیترحلال با نسبت ۲۰:۱ (حلال‌ها و نسبت‌های مورد استفاده شامل ۱۰۰ درصد آب خالص و ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد حلال آلی استون، متانول و اتانول) افزوده شد و با استفاده از روش غوطه‌وری در حلال، به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق (۲۸-۲٦

درجه سانتی‌گراد) استخراج شد. سپس عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره ٤١ فیلتر شدند و پس از سانتریفوژ (Z206A-HERMLE، آلمان) با دور ٦٠٠٠ rpm به‌مدت ١٠ دقیقه برای انجام آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین میزان فنول کل: میزان فنول کل[1] (TPC) عصاره با استفاده از روش (تاگا و همکاران، ١٩٨٤) اندازه‌گیری شد. ٢٠٠ میکرولیتر از نمونه با ٤ میلی‌لیتر (٢ درصد) Na_2Co_3، مخلوط شد و به‌مدت ٢ دقیقه در دمای اتاق (٢٨-٢٦ درجه‌سانتی‌گراد) باقی ماند. سپس ٢٠٠ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتو ٥٠ درصد به آن اضافه شد و پس از مخلوط شدن به‌مدت ٣٠ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی باقی ماند. جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر (Lambda PerkinElmer precisely، آمریکا) در طول موج ٧٢٠ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسیدتانیک در غلظت‌های ٠، ٠/٠٠٢، ٠/٠١ و ٠/٠٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج براساس میلی‌گرم اسیدتانیک برگرم پودر جلبکی خشک گزارش شد ($Y= 0.0138x, R^2= 0.9946$).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل: فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل[2] (TAC) عصاره‌های جلبکی با روش (پریتو و همکاران، ١٩٩٩) اندازه‌گیری شد. ٠/٦ میلی‌لیتر نمونه با ٠/٦ میلی‌لیتر محلول معرف (اسیدسولفوریک ٠/٦ مولار، سولفات سدیم ٢٨ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی‌مولار) در لوله‌های آزمایش درب‌دار مخلوط شدند. محلول حاصل در حمام آبی (دمای ٩٥ درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ٩٠ دقیقه قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٩٥ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسید اسکوربیک در غلظت‌های ٠/١، ٠/٢، ٠/٤ و ٠/٨ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و قدرت آنتی‌اکسیدانی کل بر حسب میلی‌گرم اسید اسکوربیک برگرم پودر جلبکی خشک شده بیان شد ($Y= 0.0032x, R^2= 0.99$).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ٢ و ٢ دی فنیل ١ پیکریل- هیدرازیل[3] (DPPH)، طبق روش (برند ویلیامز و همکاران، ١٩٩٥) انجام گرفت. دو میلی‌لیتر از عصاره به دو میلی‌لیتر از محلول متانولی ٠/١٦ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به‌مدت یک دقیقه با دستگاه ورتکس با دور ٢٥٠٠rpm (IKA, MS 3b، آمریکا) به‌خوبی مخلوط و ٣٠ دقیقه در دمای محیط در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول در طول موج

1- Total phenol content
2- Total antioxidant capacity
3- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه و به‌صورت درصد RSA[1] بیان شد.

RSA%= [1-(Asample-Asample blank)/Aconrol]*100

جذب نمونه و محلول DPPH بعد از زمان موردنظر= Asample

جذب محلول DPPH بدون نمونه= Acontrol

جذب نمونه DPPH بدون محلول= Asample blank

قدرت کاهندگی آهن: برای اندازه‌گیری قدرت کاهندگی آهن (FRAP)[2] در عصاره‌های جلبکی، از روش (چیو و همکاران، ۲۰۰۸) استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH= ٦/٦) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانات پتاسیم ۱ درصد با ۱ میلی‌لیتر از نمونه مخلوط شد. این محلول درحمام آبی با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس به‌این محلول ۲/۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱۰ درصد اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. در ادامه، ۲/۵ میلی‌لیتر از آب و ۰/۵ میلی‌لیتر از کلرید آهن (FeCl3) ۰/۱ درصد به ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط اضافه گردید. سپس این محلول در دمای محیط به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا در آن ایجاد رنگ صورت بپذیرد. جذب نمونه‌ها در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسیدتانیک در غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و قدرت کاهندگی آهن بر حسب میلی‌گرم اسیدتانیک بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شد ($Y= 0.0117x, R^2= 0.9954$).

تجزیه و تحلیل آماری: بعد از سنجش نرمال بودن داده‌ها، به‌منظور بررسی بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین نسبت‌های مختلف یک حلال از آنالیز واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها آزمون دانکن به‌کار برده شد و در نهایت جهت تعیین بهترین حلال از میان سه حلال مورد استفاده از آزمون خوشه‌ای و نرم‌افزار Mini tab (Minitab 14, state College, PA, USA) استفاده شد و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel (Microsoft office, 2010) صورت پذیرفت.

1- Radical scavening activity
2- Ferric reducing antioxidant power

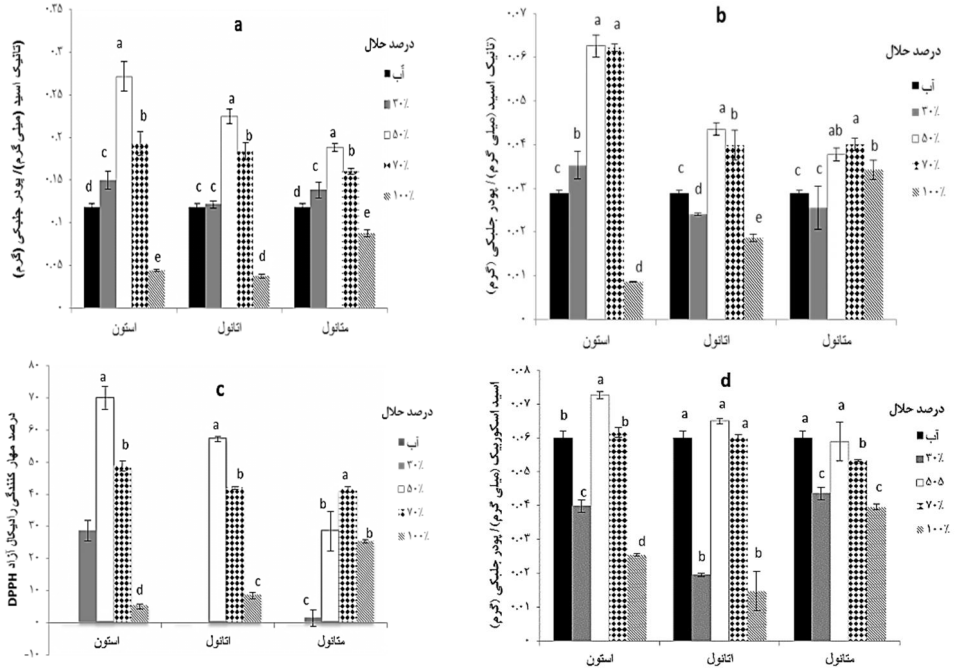
نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنولی، قدرت کاهندگی آهن، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت آنتی اکسیدانی کل در استخراج با ۳ حلال استون، اتانول و متانول با نسبت‌های مختلف در شکل ۱ آورده شده است.

به‌طورکلی روش حلالی معمولی‌ترین روش مورد استفاده در استخراج از نمونه‌های گیاهی به‌شمار می‌رود (سوزا و همکاران، ۲۰۱۱). سیستم‌های حلالی عموماً بر اساس هدف استخراج، قطبیت ترکیبات موردنظر، قطبیت ترکیبات غیرهدف و همچنین هزینه و ایمنی انتخاب می‌شوند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸). مطالعات زیادی در مورد مؤثرترین روش و حلال برای استخراج این ترکیبات وجود دارد ولی گاهی نتایج متناقضی در مورد ترکیبات و حلال‌های مختلف مشاهده می‌شود. با توجه به ساختار و خصوصیّات فیزیکوشیمیایی این ترکیبات، دستیابی به یک روش واحد امکان‌پذیر نمی‌باشد (ربیی و همکاران، ۲۰۱۱). براساس مطالعات موجود در تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گونه‌های جلبکی مختلف تنها استفاده از یک آزمایش برای شناسایی مکانیسم‌های مختلف کافی نیست (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین در این مطالعه برای درک بهتر مکانیسم‌های یاد شده چند آزمایش مختلف از جمله میزان فنول کل، فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مورد سنجش قرار گرفت.

بالاترین میزان فنول کل مربوط به استون، اتانول و متانول ۵۰ درصد و به‌ترتیب با مقایر ۰/۲۷، ۰/۲۲ و ۰/۱۸ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی و کمترین میزان فنول کل مربوط به نسبت ۱۰۰ درصد عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی و به‌ترتیب با مقادیر ۰/۰٤، ۰/۰۳ و ۰/۰۸ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی بود (شکل 1a). با افزایش حلال آلی به ۵۰ درصد میزان فنول کل نمونه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$)، و با افزایش بیشتر حلال آلی تا ۱۰۰ درصد میزان فنول کل با کاهش معنی‌داری مواجه گشت. در واقع نتایج نشان داد که افزودن مقدار معینی آب به حلال‌های آلی (استون، اتانول و متانول) ممکن است میزان استخراج فنول کل را نسبت به زمانی‌که از آب یا حلال آلی خالص استفاده می‌شود، بهبود بخشد. نوع حلال مورد استفاده نیز تأثیر معنی‌داری ($P<0/05$) بر مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها داشت. به‌طوری‌که در این بررسی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی به‌ترتیب در عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی حاصل شد و بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات فنولی، حلال استون بود. عموماً الکل و استون با درصدهای مختلف آب، به‌طور گسترده‌ای برای استخراج ترکیبات فنولی از گیاهان استفاده می‌شوند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه‌ای که

پان و همکاران (۲۰۰۳)، بر استخراج پلی‌فنول‌ها و کافئین از برگ چای سبز انجام دادند به‌این نتیجه رسیدند که مقدار پلی‌فنول‌های استخراج شده در عصاره استونی نسبت به متانول، آب و اتانول بیشتر بود. در آزمایشی که بر روی عصاره‌های آبی و ۷۰ درصد استونی ده گونه جلبکی در سواحل ایسلند انجام شد، عصاره استونی ۷۰ درصد نسبت به عصاره آبی در استخراج پلی‌فنول‌ها برای بیشتر گونه‌های جلبکی مورد آزمایش مؤثرتر بود (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۱- نمودار مقایسه‌ای پاسخ میزان فنول کل (a)، قدرت کاهندگی آهن (b)، فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH (c) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (d) در نسبت‌های مختلف هر یک از حلال‌های اتانول، متانول و استون به‌صورت جداگانه

* حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار نسبت‌های مختلف هر یک از حلال‌ها، به‌صورت جداگانه در سطح ۵ درصد می‌باشد

داده‌ها در جدول به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد

در مطالعه دیگری (ترکمن و همکاران، ۲۰۰٦)، اثر استفاده از آب و حلال‌های آلی ارگانیک با غلظت‌های مختلف را بر روی میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چای سیاه و چای میت[1] بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که در روش فولین سیوکالتو تمامی عصاره‌های آماده‌سازی شده با حلال‌های ۵۰ درصد بیشترین سطح پلی‌فنول را دارا بودند. کمترین مقدار پلی‌فنول مربوط به استون و اتانول ۱۰۰ درصد بود. به‌طورکلی ترکیبات فنولی در حلال‌های آلی قطبی نسبت به آب محلول‌ترند و حلال‌های مورد استفاده برای استخراج هنگامی‌که مخلوطی آبی از متانول، اتانول و استون باشند، مؤثر هستند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که به‌طور گسترده‌ای به عنوان ابزاری جهت تخمین مهار رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان به‌کار برده می‌شود. در آزمایش DPPH آنتی‌اکسیدان قادر به کاهش رادیکال پایدار DPPH به دی فنیل پیکرازیل زرد رنگ می‌باشد. اثر آنتی‌اکسیدان بر مهار رادیکال DPPH مربوط به توانایی اهدای هیدروژن آن می‌باشد (حسین و همکاران، ۲۰۱۲). بالاترین فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH به‌ترتیب مربوط به حلال استون و اتانول ۵۰ درصد با مقادیر ٦۹/۹۸ و ۵۷/۱۸ درصد و حلال متانول ۷۰ درصد با مقدار ٤۱/٤۰ درصد می‌باشد و حداقل فعالیت به آب ۱۰۰ درصد اختصاص دارد که در واقع خاصیت مهارکنندگی از خود نشان نداده است (شکل 1c). یکی از دلایل احتمالی این است که افزودن بیشتر از حد معین حلال/ آب، بخشی از DPPH را منعقد و آن را جهت انجام واکنش با آنتی‌اکسیدان‌ها از دسترس خارج می‌نماید و به‌این ترتیب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد (کاراداگ و همکاران، ۲۰۰۹). به‌طورکلی هنگامی‌که میزان فنول کل نمونه‌ها زیاد بود درصد مهار کنندگی رادیکال DPPH نیز افزایش معنی‌داری داشت. این مهم می‌تواند به‌دلیل مقادیر بالای پلی‌فنول موجود در جلبک‌های دریایی باشد که قابلیت عملکرد به‌عنوان جاذب رادیکال آزاد را دارند (چیو و همکاران، ۲۰۰۸). پژوهشگران دیگری نیز همبستگی مثبت بین ترکیبات فنولی و قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد را بیان کرده‌اند (لوپز و همکارانف، ۲۰۱۱). در بین عصاره‌های مختلف عصاره استونی دارای بهترین فعالیت مهارکنندگی بود. در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه جلبک سبز اینترومورفا (*Entromorgha linza, Entromorgha compressa, Entromorgha tubulosa*) بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در عصاره‌های متانولی مشاهده شد. در حالی‌که عصاره‌های پروپانولی، استونی و اتیل استاتی نیز اثر بازدارندگی خوبی نشان دادند و حداقل فعالیت مهارکنندگی در عصاره آبی مشاهده گردید (گانیسان و همکاران، ۲۰۱۱).

1- Mate

آزمایش FRAP بر اساس توانایی فنول‌ها جهت کاهش رنگ زرد کمپلکس tripridltriazine ferric (Fe) III به کمپلکس آبی رنگ ferrous (FeII) به‌وسیله عمل اهدا الکترون توسط آنتی‌اکسیدان می‌باشد (کاراداگ و همکاران، ۲۰۰۹). بیشترین قدرت کاهندگی آهن مربوط به عصاره‌های استونی ۵۰ و ۷۰ درصد با میزان ۰/۰٦، عصاره متانولی ۵۰ درصد با مقدار ۰/۰۳ و ۷۰ درصد با ۰/۰٤ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک بود که تفاوت معنی‌داری با یگدیگر نداشتند (P>۰/۰۵) و نیز عصاره اتانولی ۵۰ درصد (۰/۰٤ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده) بود. عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های خالص (آب ۱۰۰ درصد و استون، اتانول و متانول ۱۰۰ درصد) کمترین قدرت کاهندگی را از خود نشان دادند (شکل ۱b). همانند دو آزمایش فنول کل و فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH، عصاره استونی بهترین قدرت کاهندگی را از خود نشان داد. نتایج مشابه‌ای در مطالعه (گانیسان و همکاران، ۲۰۱۱) مشاهده شد. در مطالعه این پژوهش‌گران حداکثر و حداقل قدرت کاهندگی در *Entromorgha tubulosa* به‌ترتیب در عصاره استونی و آبی گزارش شد و در میان سه گونه مورد آزمایش (*Entromorgha compressa*، *Entromorgha tubulosa*، *Entromorgha linza*) عصاره استونی *E. tubulosa* قدرت کاهندگی بهتری نسبت به دو گونه دیگر نشان داد. آن‌ها گزارش کردند که عمل آنتی‌اکسیدانی کاهنده‌ها براساس شکست زنجیره رادیکال آزاد به‌وسیله اهداء یک اتم هیدوژون است. کاهنده‌ها با پیش‌سازهای خاصی از پراکسید واکنش می‌دهند و در نتیجه از تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند. ترکیبات جلبکی نیز ممکن است به شیوه مشابهی همانند کاهنده‌ها، از طریق اهداء الکترون و واکنش با رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن‌ها به محصولات پایدار و پایان بخشیدن به واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد عمل کنند.

در تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با روش فسفومولیبدینیوم، مولیبدنیوم VI (MO+6) به کمپلکس فسفات سبز رنگ (MO+5) کاهش می‌یابد. مطابق شکل (d ۱)، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در آب ۱۰۰ درصد و استون ۵۰ درصد به‌ترتیب با مقادیر ۰/۰٦ و ۰/۰۷ میلی‌گرم اسید اسکوربیک بر گرم پودر جلبکی خشک شده بود که اختلاف معنی‌داری (P>۰/۰۵) با حلال اتانول با نسبت ۵۰ و ۷۰ درصد و حلال متانول با نسبت ۵۰ درصد نداشت. استفاده از آب به‌عنوان حلال در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پایین به میزان کمتری استخراج می‌شوند و علاوه‌بر این حضور ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول در عصاره آبی نیز باعث اختلال در تشخیص و تعیین

مقدار ترکیبات فنولی می‌شوند. هر چند حضور ترکیبات فوق شاید دلیلی بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در آب خالص باشد (کرینوس و همکاران، ۲۰۰۷).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی مقدار استخراج پلی‌فنول‌ها از مواد گیاهی مختلف و با سیستم‌های حلالی متفاوت بستگی به غلظت حلال، روش استخراج و گونه جلبکی دارد. براساس این پژوهش با توجه به حلال مورد استفاده برای استخراج ترکیبات فنولی، عصاره‌های به‌دست آمده از جلبک قرمز از لحاظ غلظت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار متفاوت می‌باشند. افزودن مقدار معینی آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط قطبی همراه می‌باشد و شرایط بهتری را برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراهم می‌کند. در این مطالعه حلال استون بهترین حلال و نسبت ۵۰ درصد بهترین نسبت جهت استخراج ترکیبات فنولی از جلبک قرمز است که می‌تواند این‌گونه را به‌عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه قرار دهد.

منابع

1.Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology, 28: 25-30.
2.Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., and Khoo, K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT-Food Science and Technology, 41: 1067-1072.
3.Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruíz and amp; Pavón) tubers. Separation and Purification Technology, 55: 217-225.
4.Ganesan, K., Kumar, K.S. and Rao, P.V.S. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, Enteromorpha from Okha, Northwest coast of India. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12: 73-78.
5.Ganesan, P., Kumar, C.S. and Bhaskar, N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. Bioresource Technology, 99: 2717-2723.
6.Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B. and Barry-Ryan, C. 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana*) using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry, 19: 3. 582-590.

7.Karadag, A., Ozcelik, B., and Saner, S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food analytical methods, 2: 1. 41-60.
8.López, A., Rico, M., Rivero, A., and Suárez de Tangil, M. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chemistry, 125: 3. 1104-1109.
9.Nahas, R., Abatis, D., Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Vagias, C., and Roussis, V. 2007. Radical-scavenging activity of aegean sea marine algae. Food Chemistry, 102: 3. 577-581.
10.Pan, X., Niu, G., and Liu, H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 42: 2. 129-133.
11.Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L., and Medina, I. 2005. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. Food Chemistry, 92: 3. 547-557.
12.Plaza, M., Cifuentes, A., and Ibáñez, E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. Trends in Food Science and Technology, 19: 31-39.
13.Pokorný, J. 2007. Are natural antioxidants better-and safer–than synthetic antioxidants? European J. Lipid Science and Technology, 109: 629-642.
14.Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, 269: 337-341.
15.Rastian, Z., Mehranian, M., Vahabzadeh, F., and Sartavi, K. 2007. Antioxidant activity of extract from a brown alga (*Sargassum boveanum*). African J. Biotechnology, 6: 24. 2740-2745.
16.Rebey, I.B., Bourgou, S., Debez, I.B.S., Karoui, I.J., Sellami, I.H., Msaada, K., Limam, F. and Marzouk, B. 2011. Effects of extraction solvents and provenances on phenolic contents and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum*) seeds. Food and Bioprocess Technology. 1-10.
17.Ruberto, G., Baratta, M.T., Biondi, D.M., and Amico, V. 2001. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus cystoseira in a micellar model system. J. applied phycology, 13: 5. 403-407.
18.Sakanaka, S., Tachibana, Y., and Okada, Y. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of *Japanese persimmon* leaf tea (kakinoha-cha). Food Chemistry, 89: 569-575.
19.Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Quintas, M.A.C., Ferreira, A.N.C.S., Teixeira, J.A., and Vicente, A.N.A. 2011. Antioxidant potential of two red seaweeds from the brazilian coasts. J. Agricultural and Food Chemistry, 59: 5589-5594.
20.Taga, M.S., Miller, E.E., and Pratt, D.E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. J. American Oil Chemist's Society. 61: 5. 928-931.

21. Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. Food Chemistry, 99: 835-841.
22. Wang, B.G., Zhang, W.W., Duan, X.J., and Li, X.M. 2009. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga (*Rhodomela confervoides*). Food Chemistry, 113: 1101-1105.
23. Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., and Li, X. 2008. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry, 106: 2. 804-810.
24. Wang, T., Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry, 116: 1. 240-248.
25. Yuan, Y.V., and Walsh, N.A. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. Food and Chemical Toxicology, 44: 1144-1150.