ارزیابی محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی دو گونه از جلبک های سبز به روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

ناصر جعفری[۱]، زهرا علوی[۲]، محمد علی ابراهیم زاده[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۴/۱۹
تاریخ تصویب: ۹۴/۱۲/۱۱

چکیده

جلبک ها از جنبه های بسیار زیادی حائز اهمیت می باشند که می توانند کاربردهای متعددی در صنایع دارویی، غذایی، کشاورزی، پزشکی و همچنین کاربرد در تصفیه فاضلاب داشته باشند. این تحقیق به منظور بررسی محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی دو نوع جلبک سبز به روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد. در این تحقیق جلبک Cladophora glomerata از سواحل دریای خزر و مصب رودخانه بابل رود و جلبک Spirogyra rivularis از مزارع شالیزاری و پساب دامداری جمع آوری شدند. سپس عصاره استخراج شده با استفاده از متانول اسیدی تهیه و ترکیبات فنولی تام آن به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری و برای

۱ دانشیاردانشگاه مازندران (نویسنده مسئول n.jafari@umz.ac.ir)
۲ استادیار دانشگاه مازندران
۳ دانشیار علوم پزشکی ساری

(DOI): 10.22051/jab.2016.2469

آنالیز فلاونوئیدهای موجود در گیاه از روش HPLC استفاده شد. عصاره جلبک کلادوفورا (Cladophora) مصب رودخانه (µg/ml ۰۶/۵۴۶±۰۶/۱۵) و جلبک اسپیروژیر (Spirogyra) شالیزاری (µg/ml ۱۰/۱۹۰±۴۱/۵) فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را در به دام اندازی رادیکال DPPH و جلبک کلادوفورا (Cladophora) دریای خزر (µg/ml ۹۶/۲۰۰۴±۵۷/۵۱) کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در به دام اندازی رادیکالDPPH نشان دادند. جلبک کلادوفورا (Cladophora) مصب (µg/ml ۹±۲۱۷/۳۶۲) و جلبک اسپیروژیر (Spirogyra) شالیزار (µg/ml ۹۰/۱۵±۰۹۸/۳۶۸) حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی و جلبک کلادوفورا (Cladophora) دریای خزر (µg/ml ۳۰/۲۸±۸۵۲) کمترین فعالیت را در به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید نشان دادند. عصاره جلبک کلادوفورا (Clado-phora) مصب فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را در آزمون احیاء کنندگی آهن III نشان داد (µg/ml ۰۳/۰± ۷۳۷/۰) و کمترین فعالیت در آزمون احیائ کنندگی آهن در جلبک کلادوفورا (Cl-adophora) دریای خزر (µg/ml ۰۰/۰± ۰۰۳/۰) مشاهده گردید. با توجه به کروماتوگرام استاندارد زمان بازداری اسید گالیک (mg/g ۳۸۳/۲)، اسید کوماریک (mg/g۸۱۷/۳) و کوئرستین (mg/g۲۱۷/۷) می باشد. بیشترین زمان بازداری مربوط به کوئرستین و کمترین زمان بازداری مربوط به اسید گالیک نشان داده شد. این دو نوع جلبک سبز دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشند. این خاصیت به دلیل وجود ترکیبات فنولیک و سایر ترکیبات آنتی اکسیدانی در آنها می باشد. بنابراین، این جلبک ها می توانند به عنوان منبعی از آنتی اکسیدان های طبیعی مورد پژوهش بیشتر قرار گیرند.

واژه های کلیدی: کلادوفورا (Cladophora)، اسپیروژیر (Spirogyra)، ترکیبات فنولی، فلاونوئید، HPLC.

مقدمه

جلبک ها برای مصارف گوناگون به صورت صنعتی در مقیاس وسیع تولید و به عنوان غذای سالم منبع ویتامین و مواد معدنی در غذای انسان، خوراک دام، پرورش آبزیان و برای تصفیه بیولوژیک آبهای صنعتی به کار می روند. امروزه جلبک شناسان در کشورهای مختلف، در کنار تحقیقات زیستی خود درباره جلبک ها، به دنبال کشف خواص مفید و روش های استفاده اقتصادی از آنها هستند. به هر حال، از زمان پی بردن به چنین خواص کارآمدی در جلبک ها، به نظر می رسد با توجه به پیشرفت کشاورزی و آبزی پروری ارگانیک، بازار رو به رشد فزاینده ای داشته باشد(Brown et al., 1989) . در انگلستان از جلبکها به عنوان کود برای محصولاتی چون سیب زمینی، کلم و سبزیجات استفاده می شود. در کشورهای هندوستان و سیلان و برزیل از جلبک گراسیلاریا برای تقویت گیاه قهوه و نارگیل استفاده می شود. علاوه بر آن جلبک های دریایی نیز به عنوان منبع آنتی اکسیدان ها و اکسیدان های پلی فنول مورد توجه قرار گرفته اند. فنول ها گروه مهمی از ترکیبات طبیعی، با خواص آنتی اکسیدانی و دیگر خواص بیولوژیکی هستند (El-Baky et al., 2009). همچنین جلبک ها حاوی چندین ماده شیمیایی با ارزش اقتصادی مثل ویتامین ها، کارتنوئیدها، پیکو بیلی پروتئین ها، پلیول ها، پلی ساکارید ها و اسیدهای چرب می باشند. که دارای خواص ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد قارچی و مواد محرک ایمنی می باشد (Hanna et al., 200). جلبک ها موجوداتی غنی از متابولیتهای اولیه و ثانویه هستند که می توانند به عنوان ترکیبات فعال زیستی در صنعت داروسازی مورد توجه قرار گیرند(Rania and Hala, 2008) . متابولیتهای ثانویه گیاهی ترکیبات آلی هستند که مستقیماً در رشد و نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند، این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده تری نسبت به متابولیت های اولیه مانند اسید های آمینه که برای بقای سلول ها ضروری اند می باشند. آلکالوئید ها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، رنگیزه ها و تانن ها از جمله مهمترین این ترکیبات هستند. یکی از این جلبکهای سرشار از متابولیتهای ثانویه، جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) و کلادوفورا (*Cladophora*) است که جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) ساختمانی رشته ای دارد و در آب های شیرین مثل آب برکه ها، استخرها یا جویبارها زیست می کند. این جلبک را بخاطر کلروپلاست فنر مانند آن، اسپیروژیر (*Spirogyra*) نامیدند که در طبیعت به فراوانی وجود دارد و همچنین جلبک رشته ای منشعب

کلادوفورا (*Cladophora*) که در نواحی ساحلی و رودخانه ها یافت می شود (Plaza et al., ۲۰۰۸) و هر دو از شاخه ی جلبکهای سبز (Chlorophyta) می باشند. در این مطالعه مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره های متانولی استخراج شده از جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) و کلادوفورا (*Cladophora*) در مناطق مختلف مورد بررسی قرار گرفت تا به بهترین شرایط برای بالاترین میزان آنتی اکسیدان پی برده و از آن برای دسترسی به منابع غذایی بهتر استفاده شود.

صنوبری و همکاران (۱۳۹۱) بر ارزیابی محتوای تام فنول و فلاونوئیدی جلبک *Cladophora glomerata* و *Spirogyra rivularis* پرداختند، آن ها بیان کردند که میزان محتوای تام فنول جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) در مقایسه با اسپیروژیر (*Spirogyra*) تفاوت اندکی را نشان می دهد ولی در مورد میزان فلاونوئید این مقدار چشمگیر می باشد. این مسئله می تواند به دلیل مصرف اسپیروژیر (*Spirogyra*) در برخی از کشورها به عنوان غذا باشد. لونی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی خاصیت دارویی و آنتی اکسیدانی جلبک ها برای بهره برداری از منابع طبیعی و آب های شور پرداختند. آن ها به این نتایج رسیدند که جلبک ها به دلیل دارا بودن ترکیبات ویژه پلی ساکاریدی و نیز ترکیبات دارویی خاص دارای کاربردهای وسیعی خواه به صورت مصرف مستقیم دارویی و خواه بصورت مصرف ترکیبات آنها درطی فرایند داروسازی هستند، همچنین از جلبک های دریایی بعنوان غذای جایگزین حاوی کمی پروتئین، تمام اسیدآمینه ضروری، ویتامین ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه مانند آراشیدونیک اسید را دارا هستند

(Velioglu and Mazza 1991) در تحقیقی فلاونوئیدهای گلبرگ گل‌محمدی را توسط HPLC برای جداسازی و اندازه‌گیری ترکیب‌های فلاونوئیدی مورد ارزیابی قرار دادند. در این بررسی بیش از ۲۵ پیک ردیابی شده و جداسازی ترکیباتی شامل کامفرول، کوئرستین و گالاکتوز انجام شد. Nerg و همکاران (۱۹۹۴) با بررسی اثر فصول و تنوع جغرافیایی بر غلظت مونوترپن ها، فلاوونویید ها و اسید های رزین در گیاه Pinus sylvestris L. دریافتند که در عرض جغرافیایی مختلف میزان این ترکیبات متفاوت است .(Nerg et al., 1994) Singh و همکاران (۲۰۰۲) سه حلال مختلف (آب، متانول و اتیل استات) را برای استخراج ترکیبات فنولیک از پوست و دانه انار استفاده نمودند که در این تحقیق متانول بیشترین بازده را نشان داد. روش سوکسله، روش معمول برای استخراج این ترکیبات می باشد که راندمان آن به نوع حلال نیز بستگی دارد ولی از آب، متانول، اتیل استات و دی اتیل اتر برای استخراج پلی فنول ها

استفاده گردیده است .(Singh et al., 2002)

مواد و روش ها

نمونه های جلبک کلادوفورا (*Clado-phora glomerata*) از دریای خزر واقع در سواحل بابلسر و مصب رودخانه بابل رود و نمونه های جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra rivularis*) از مزرعه شالیزاری و پساب دامداری جمع آوری شدند. پس از جداسازی موجودات آبزی و دانه های شن به منظور عصاره گیری با متانول ۷۰ درصد مخلوط شده و به روش سوکسله عصاره گیری شد، متانول توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف گردید و عصاره ها توسط دستگاه فریز درایر خشک شدند. تمام مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان خریداری شدند و دارای بالاترین درصد خلوص بودند.

اندازه گیری محتوای تام فنولی عصاره ها

محتوای تام فنولی با استفاده از معرف فولین - سیو کالتیو اندازه گیری شد. به نیم میلی لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) ۵/۲ میلی لیتر واکنشگر فولین سیو کالتیو ۲/۰ نرمال اضافه شده، پس از ۵ دقیقه ۲ میلی لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. جذب مخلوط ۲ ساعت بعد در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد، اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت. میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد (Ordon˜ez, et al., 2006).

اندازه گیری محتوای تام فلاونوئید عصاره ها

محتوای تام فلاونوئید با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم اندازه گیری شد. به ۵/۰ میلی لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۵/۱ میلی لیتر متانول، ۱/۰ میلی لیتر از محلول آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد در اتانول، ۱/۰ میلی لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و ۸/۲ میلی لیتر از آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید، آزمایشات ۳ بار تکرار و میانگین آن ها گزارش شد .(Chang et al., 2002) شرایط کروماتوگرافی مایع سیستم کانوئر اسمارت لاین ۱۰۰۰ و ستونکانوئر (۴ × ۲۵۰

میلی متر) برای این آنالیز استفاده شد. تمام محلول ها، با آب دیونیزه تهیه شد و جدا سازی به روش ایزوکراتیک و با استفاده از فاز متحرک با نسبت ٪۴۰ آب (که حاوی ٪۲/۰ اسید فسفریک) و ٪۶۰ متانول و جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه و حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. ابتدا دیتکتور UV به مدت ۱۰ دقیقه گرم شد و قبل از تزریق نمونه فاز متحرک به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایش از ستون جدا سازی عبور داده شد سپس با استفاده از سرنگ ۲۰ میکرو لیتر نمونه ها به دستگاه تزریق شدند. جدا سازی در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد.

آماده سازی نمونه ها و استاندارد جهت آنالیز HPLC

جهت تهیه محلول استاندارد، ۵ میلی گرم کوماریک اسید، کوئرستین و گالیک اسید را در ۵۰ میلی لیتر متانول حل کرده و سپس غلظت های پایین تر، با استفاده از این محلول تهیه شدند. محلول سپس از فیلتر ۲/۰ میکرولیتر عبور داده شد. مقدار ۲۵ میلی گرم از عصاره های خشک مناطق مختلف به طور جداگانه در ۲۵ میلی لیتر متانول حل و از فیلتر ۲/۰ میکرولیتر عبور داده شد. محلول ها جهت تزریق به دستگاه HPLC آماده شدند.

آنالیز آماری داده ها

تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده مربوط به اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و نیز ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد و قدرت احیاءکنندگی در قالب فاکتوریل به صورت طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار صورت پذیرفت و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد و نمودارها با نرم افزار Ex-cel رسم شده است. همچنین ضرایب همبستگی ساده بین زوج صفات برای به دست آوردن میزان ارتباط صفات با یکدیگر به روش پیرسون محاسبه شد.

نتایج

محتوای تام فنولی

محتوای تام فنولی با متد فولین-سیوکالتیو (Slinkard and Single-ton, 1977) به صورت اکی والان گالیک اسید در گرم عصاره بر اساس معادله خط منحنی استاندارد (رابطه ۱) محاسبه شد و نتایج آن در جدول (۱) آمده است.

رابطه ۱:

$$Y = 0.005X + 0.063 \quad R^2 = 0.998$$

جدول ۱: محتوای تام فنولی موجود در عصاره های متانولی جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*)

نوع گیاه	نمونه مورد بررسی	ارزیابی محتوای تام فنول (mg/g)
کلادوفورا	جلبک کلادوفورا دریای خزر	۹/۶۸ ± ۰/۶۸
	جلبک کلاوفورا مصب	۹۶/۳۲ ± ۲/۶۲
اسپیروژیر	اسپیروژیر مزرعه شالیزاری	۵۶/۴۶ ± ۱/۷۶
	اسپیروژیر پساب دامداری	۳۰/۶ ± ۰/۹۹

محتوای تام فلاونوئیدی

محتوای فلاونوئیدی تام بر مبنای معادله خط منحنی استاندارد (رابطه ۲) برای عصاره متانولی جلبک های مناطق مختلف به صورت اکی والان میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره محاسبه شد. جدول (۲) مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را نشان می دهد.

رابطه ۲: $Y = 0.006X - 0.007 \quad R^2 = 0.999$

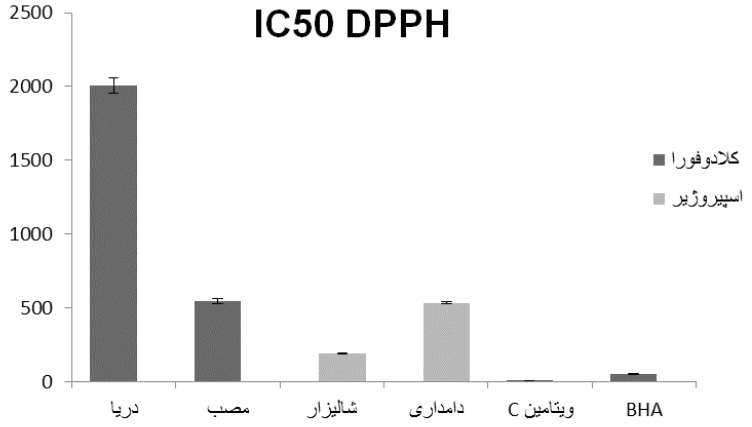
جدول ۲: محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*)

نوع گیاه	نمونه مورد بررسی	ارزیابی محتوای تام فلاونوئیدی(mg/g)
کلادوفورا	جلبک کلادوفورا دریای خزر	۱۶/۳۲ ± ۱/۳۰
	جلبک کلاوفورا مصب	۱۴۹/۹۲ ± ۵/۷۱
اسپیروژیر	اسپیروژیر مزرعه شالیزار	۶۳/۵۹ ± ۱/۳۴
	اسپیروژیر پساب دامداری	۱۳۱/۵۶ ± ۳/۰۹

هریک از مقادیر جدول میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف ± انحراف استاندارد می‌باشد.

روش DPPH

رادیکال آزاد DPPH یکی از پرکاربردترین روش‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی می باشد. شکل (۱) IC۵۰ (غلظتی را که در آن ٪۵۰ رادیکال DPPH مهار می شود) عصاره های متانولی جلبک کلادوفورا (*Cl-adophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) را در مناطق مختلف نشان می دهد. آسکوربیک اسید و BHA به عنوان استاندارد برای



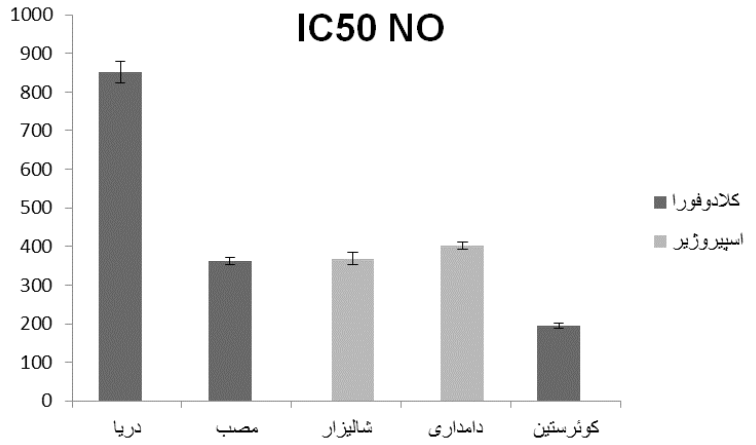
شکل ۱: نمودار مقایسه ای میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) مناطق مختلف در به دام اندازی رادیکال DPPH (میکروگرم بر میلی لیتر).

مقایسه مورد استفاده قرار گرفت.

عصاره جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) مصب رودخانه (۵۴۶/۰۶±۱۵/۰۶ µg/ml) و عصاره جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) مزرعه شالیزاری (۱۹۰/۱۰ ± ۵/۴۱ µg/ml) فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را در به دام اندازی رادیکال DPPH و جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) دریای خزر (۲۰۰۴/۹۶ ± ۵۱/۵۷ µg/ml) کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در به دام اندازی رادیکال DPPH نشان داد، چرا که هر چه میزان IC۵۰ نمونه کمتر باشد، نشان دهنده بیشتر بودن میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آن است، شکل (۱).

روش به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید

نتایج ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی دو جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) در روش به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید، با محاسبه IC۵۰، غلظتی را که ٪۵۰ رادیکال آزاد نیتریک اکساید مهار گردد در شکل (۲) آمده است. کوئرستین به عنوان استاندارد



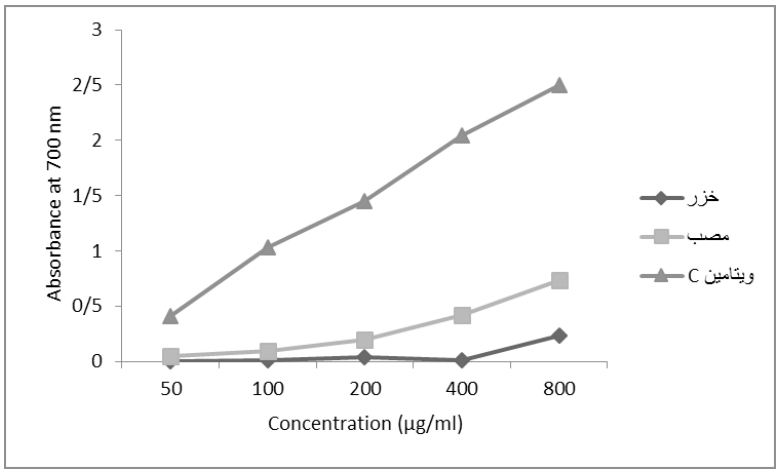
شکل ۲ : نمودار مقایسه ای میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) در به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید (میکروگرم بر میلی لیتر).

برای مقایسه بکار گرفته شد.

با توجه به شکل (۲)، جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) مصب (۳۶۲/۲۱۷ ± ۹ µg/ml) و جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) مزرعه شالیزاری (۳۶۸/۰۹۸ ± ۱۵/۹۰ µg/ml) حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی و جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) دریای خزر (۸۵۲ ± ۲۸/۳۰ µg/ml) کمترین فعالیت را در به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید نشان داد.

ارزیابی میزان احیاکنندگی

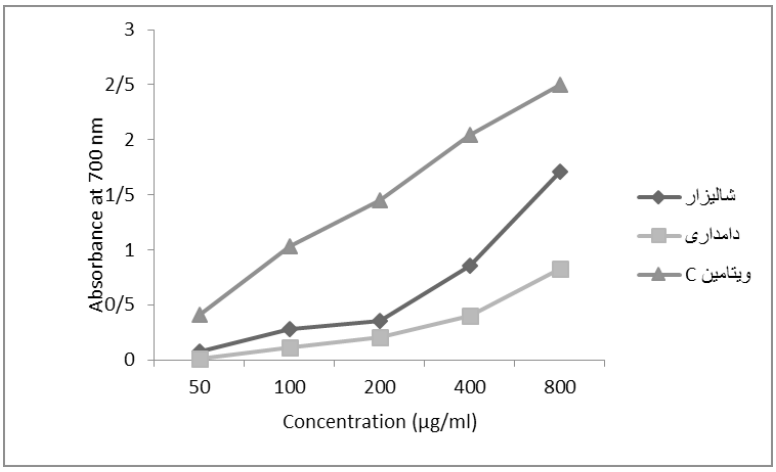
در روش قدرت احیاء کنندگی توانایی عصاره ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می شود. میزان کمپکس آهن با اندازه گیری میزان تشکیل آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. شکل (۳ و ۴) میزان جذب در آزمون احیاء کنندگی عصاره های متانولی جلبک کلادوفورا



شکل ۳ : نمودار مقایسه ای میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و استاندارد ویتامین C در احیاء آهن III

(*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) را نشان می دهد. افزایش جذب در این طول موج حاکی از افزایش قابلیت احیاء کنندگی می باشد. آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت.

بر اساس شکل (۳) عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) مصب ± ۰/۷۲۷) (µg/ml ۰/۰۳فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری را در آزمون احیاء کنندگی آهن III نشان

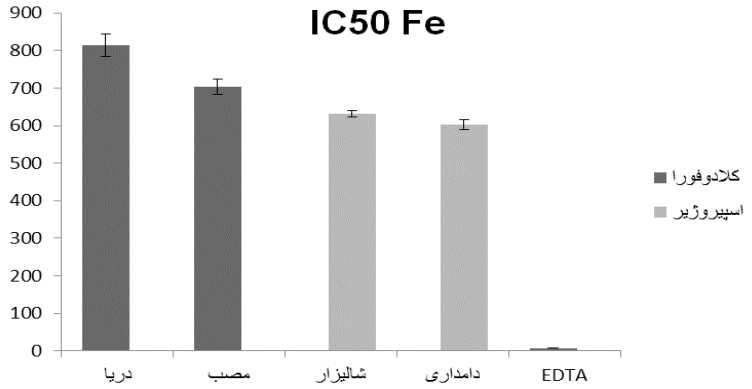


شکل ۴ : نمودار مقایسه ای میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) و استاندارد ویتامین C در احیاء آهن III

داد در صورتیکه از فعالیت ضعیف تری نسبت به ویتامین C برخوردار است± ۵/۲) (µg/ml ۰/۱۵ و کمترین فعالیت در آزمون احیائ کنندگی آهن در جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) دریای خزر ۰/۰۰ ± ۰/۰۰۳) (µg/ml مشاهده گردید.

عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) مزرعه شالیزاری ۰/۰۴ ± ۰/۷۱۴) (µg/ml فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری را در آزمون احیاء کنندگی آهن III نشان داد در صورتیکه از فعالیت ضعیف تری نسبت به ویتامین C برخوردار است (µg/ml ۰/۱۵ ± ۲/۵) و کمترین فعالیت در آزمون احیای کنندگی آهن در جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) دامداری ۰/۰۱۳) (µg/ml ۰/۰۰ ± مشاهده گردید. قدرت احیاکنندگی تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش می‌یابد اما این عصاره‌ها در مقایسه با آسکوربیک اسید میزان احیاکنندگی کمتری نشان داده‌اند (شکل ۴).

آزمون شلاته دهندگی فلزات



شکل ۵ : نمودار مقایسه ای میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*)، اسپیروژیر (*Spirogyra*) و استاندارد EDTA در آزمون شلاته دهندگی آهن II (میکروگرم بر میلی لیتر).

میزان شلات دهندگی آهن توسط عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) با محاسبه IC۵۰، غلظتی که ۵۰٪ آهن محیط مهار می گردد در شکل (۵) آمده است. در این تست EDTA به عنوان استاندارد انتخاب شد به گونه ای که به طور کامل یون فروس را شلات داده و از محیط خارج می کند. عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) دامداری فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری را از خود نشان دادند (۶۰۱/۹۶۱ ± ۱۳/۴۱ µg/ml)، ولی در مقایسه با استاندارد EDTA (۷/۹۳ ± ۰/۰۲ µg/ml) این میزان فعالیت بسیار کم است. عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) دریای خزر با میزان (۸۱۴/۳۸۷ ± ۲۹/۸۸ µg/ml)کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در آزمون شلاته دهندگی آهن II نشان داده است (شکل ۵).

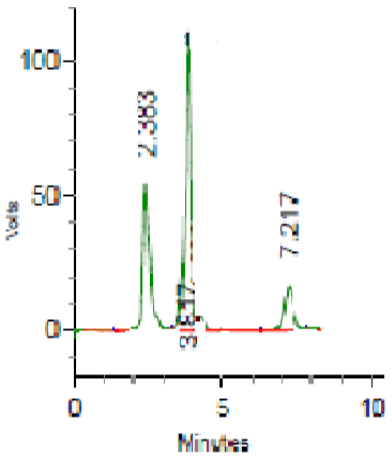
آنالیز سه ترکیب فنولی با استفاده از HPLC

باتوجه به زمان بازداری، میزان سه ترکیب فنولی (گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین) درعصاره های متانولی جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) شناسایی شدند، و میزان هر یک از ترکیبات با ارزیابی سطح زیر پیک ایجاد شده توسط هر ترکیب محاسبه شد. بیشترین میزان ترکیبات فنولی در عصاره جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) مصب مشاهده شد، این جلبک از گالیک اسید (۴/۸۳۲ µg/g)، کوماریک اسید (۰/۳۶۹ µg/g)

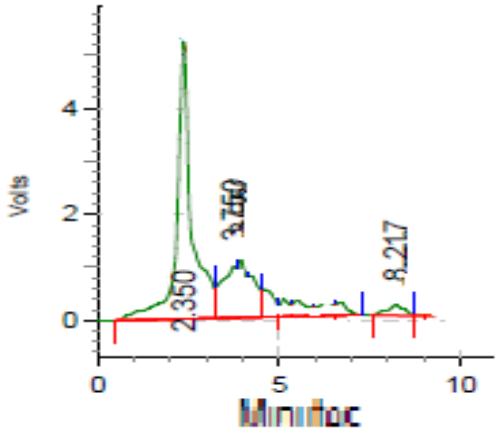
جدول ۳: میزان سه ترکیب فنولی موجود درعصاره جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*)

نمونه مورد بررسی	گالیک اسید (mg/g)	کوماریک اسید (mg/g)	کوئرستین (mg/g)
جلبک کلادوفورا دریای خزر	۰/۱۶۲	۰/۱۰۶	۰/۱۷۵
جلبک کلادوفورا مصب	۴/۸۳۲	۰/۳۶۹	۰/۶۲۵
جلبک اسپیروژیر مزرعه شالیزاری	۱۱/۵۶۳	۱/۸۹۹	۰/۸۸۶
جلبک اسپیروژیر دامداری	۶/۴۷۲	۰/۵۱۱	۰/۳۳۰

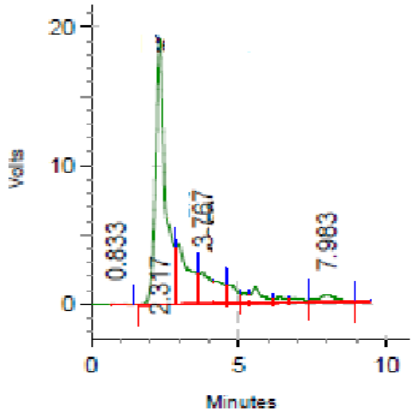
و کوئرستین (۰/۶۲۵ µg/g) بیشتری در مقایسه با سایر نمونه ها برخوردار بود. در عصاره جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) مزرعه شالیزاری نسبت به پساب دامداری از ترکیبات فنولی بیشتری مشاهده شد. میزان ترکیب فنولی گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) در مناطق مختلف در جدول (۳) نشان داده شد. شکل های شماره ۶ تا ۱۰ کروماتوگرام سه ترکیب فنولی موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر



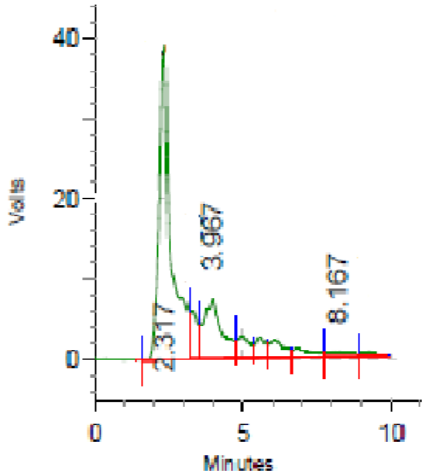
شکل ۶ : نمودار HPLC استاندارد (شامل گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین)



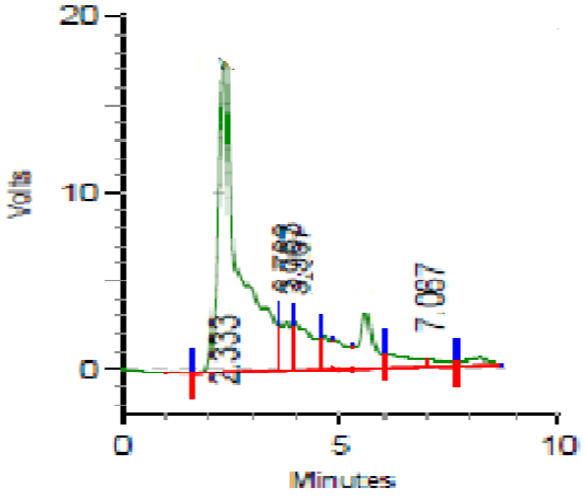
شکل ۷ : نمودار HPLCعصاره جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) دریای خزر



شکل ۸ : نمودار HPLC عصاره جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) مصب



شکل ۹ : نمودار HPLC عصاره جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) مزرعه شالیزاری



شکل ۱۰: نمودار HPLC عصاره جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) پساب دامداری

(*Spirogyra*) در مناطق مختلف را نشان می *Spirogyra*. بر طبق کروماتوگرام استاندارد (Chang et al., 2002) زمان بازداری اسید گالیک (۲/۳۸۳ µg/g)، اسید کوماریک (۳/۸۱۷ µg/g) و کوئرستین (۷/۲۱۷ µg/g)می باشد. همانطور که در شکل های شماره ۶ تا ۱۰ مشاهده می شود بیشترین زمان بازداری مربوط به کوئرستین و کمترین زمان بازداری مربوط به گالیک اسید می باشد.

آنالیز آماری داده ها

نتایج آماری و ضرایب همبستگی بین ترکیبات ثانویه جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) و ارتباط این ترکیبات با پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب در جدولهای (۴ و ۵) و پیوست های ۱ و ۲ نشان داده شد.

بر اساس آنالیز ضریب همبستگی بین زوج صفات (پیرسون)، بین میزان فنول کل، فلاونوئید کل، اسید گالیک، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها در مناطق مختلف تفاوت معنی داری از لحاظ آماری مشاهده شد (P<۰۵/۰). یعنی به لحاظ آماری، میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب نوع صفت با هم تفاوت داشته و یکسان نمی‌باشد و مقدار صفت با تغییر ترکیبات و تغییر منطقه تغییر می کند. در جلبک کلادوفورا (*Cladophora*)، بین میزان فنول با فلاونوئید، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی مثبت معنی دار وجود دارد. بین میزان فلاونوئید با فنول، گالیک اسید،

جدول ۴ : همبستگی بین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره جلبک کلادوفورا

پارامترها	فنول	فلاونوئید	گالیک اسید	کوماریک اسید	کوئرستین
فنول	۱	۰/۹۶۲**	۰/۹۵۶**	۰/۹۷۰ **	۰/۹۷۶**
فلاونوئید	۰/۹۶۲**	۱	۰/۹۹۰ **	۰/۹۹۶**	۰/۹۹۳**
گالیک اسید	۰/۹۵۶**	۰/۹۹۰ **	۱	۰/۹۸۳**	۰/۹۹۸ **
کوماریک اسید	۰/۹۷۰ **	۰/۹۹۶**	۰/۹۸۳**	۱	۰/۹۹۱ **
کوئرستین	۰/۹۶۷**	۰/۹۹۳**	۰/۹۹۸ **	۰/۹۹۱ **	۱

جدول ۵ : همبستگی بین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره جلبک اسپیروژیر

پارامترها	فنول	فلاونوئید	گالیک اسید	کوماریک اسید	کوئرستین
فنول	۱	-۰/**۹۹۱	۰/**۹۷۶	۰/**۹۹۶	۰/**۹۹۵
فلاونوئید	-۰/**۹۹۱	۱	-۰/۹۸۱**	-۰/۹۹۸**	-۰/**۹۹۹
گالیک اسید	۰/**۹۷۸	-۰/**۹۸۱	۱	۰/**۹۷۶	۰/**۹۸۳
کوماریک اسید	۰/**۹۹۶	-۰/**۹۹۸	۰/**۹۷۶	۱	۰/**۹۹۹
کوئرستین	۰/**۹۹۵	-۰/**۹۹۹	۰/**۹۸۳	۰/۹۹۹**	۱

** اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد.

کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی مثبت (r=۹۶/۰ =r، ۹۹/۰ =r، ۹۹/۰=r،) معنی دار مشاهده شده است (جدول ۴). در جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*)، بین میزان فنول با گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی مثبت و بین میزان فلاونوئید با فنول، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی منفی (r= -۹۹۱/۰، r= -۹۹۸/۰، r= -۹۸۱/۰، r= -۹۹۹/۰) مشاهده شد (جدول ۵).

نتایج آنالیز ضریب همبستگی بین زوج صفات (پیوست ۱) نشان می دهد که در جلبک کلادوفورا (*Cladophora*)، بین میزان فلانوییید با IC۵۰ آزمون DPPH، نیتریک اکساید و شلاته دهندگی آهن در سطح ۱ درصد همبستگی منفی و با فنول، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی مثبت (به ترتیب: r= ۹۶/۰، r= ۹۹/۰، r= ۹۹/۰، r=۹۹/۰) وجود دارد. بین میزان IC۵۰ آزمون DPPH با فنول، فلاونوییید، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی منفی و با IC۵۰ آزمون شلاته و نیتریک اکساید همبستگی مثبت در سطح ۱ درصد مشاهده شد. IC۵۰

آزمون نیتریک اکساید با فنول، فلاونوئید، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی منفی (به ترتیب: r، = ۹۵/۰- r = ۹۹/۰- = r، ۹۹/۰- = r، ۹۸/۰- =r، ۹۹/۰) و با IC۵۰ آزمون DPPH و شلاته دهندگی همبستگی مثبت نشان داده شد. IC۵۰ آزمون شلاته دهندگی با فنول، فلاونوئید، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی منفی و با IC۵۰ آزمون DPPH و نیتریک اکساید همبستگی مثبت مشاهده شد. در جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*)، بین میزان فنول با فلانوییید و IC۵۰ آزمون DPPH همبستگی منفی (به ترتیب: r، ۹۹۲/۰- =r= ۹۹۱/۰-) و معنی داری در سطح ۱ درصد وجود دارد. بین فنول با گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی مثبت و با IC۵۰ آزمون اسید نیتریک و شلاته دهندگی رابطه معنی دار مشاهده نشده است. بین میزان فلاونوییید با فنول، گالیک، کوماریک و کوئرستین همبستگی منفی (به ترتیب: r،= ۹۹۱/۰- =r= ۹۹۹/۰-، =r= ۹۹۸/۰-، =r= ۹۸۱/۰-) و با IC۵۰ آزمون DPPH همبستگی مثبت (r= ۹۹۴/۰-) و با شلاته و اسید نیتریک همبستگی معنادار مشاهده نشد. بین میزان IC۵۰ آزمون DPPH با گالیک، کوماریک و کوئرستین همبستگی منفی (به ترتیب: r، ۹۴۴/۰- =r، ۹۸۷/۰- =r= ۹۹۸/۰-) وجود دارد. با توجه به آنالیز ضریب همبستگی بین صفات انتی اکسیدانی و ترکیبات فنولی همبستگی وجود دارد (پیوست ۲).

پیوست ۱ : همبستگی بین ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی با فاکتورهای محیط آب در عصاره جلبک کلادوفورا (*Cladophora*)

پارامتر/	فنول	فلاونوئید	دي‌فنيل- پيكريل- هيدرازيل	نیتریک اکسید	گالیک اسید	کوماریک اسید	کوئرستین	درجه حرارت	اسیدیته	هدایت الکتریکی	نیترات	نیتریت	فسفات	فسفر	سولفات	آهن
فنول	1	.962**	-.979**	-.952**	.956**	.970**	.967**	-.970**	-.430	-.970**	-.976**	-.987**	.977**	.973**	.955**	.971**
فلاونوئید	.962**	1	-.996**	-.996**	.990**	.996**	.993**	-.998**	-.549	-.998**	-.998**	-.988**	.993**	.990**	.997**	.992**
دي‌فنيل- پيكريل- هيدرازيل	-.979**	-.996**	1	.991**	-.994**	-.994**	-.997**	.999**	.521	.999**	1.000**	.995**	-.997**	-.988**	-.995**	-.998**
نیتریک اکسید	-.952**	-.996**	.991**	1	-.989**	-.995**	-.993**	.996**	.617	.996**	.993**	.975**	-.991**	-.989**	-.993**	-.993**
گالیک اسید	.956**	.990**	-.994**	-.989**	1	.983**	.998**	-.994**	-.538	-.994**	-.993**	-.983**	.990**	.971**	.996**	.997**
کوماریک اسید	.970**	.996**	-.994**	-.995**	.983**	1	.991**	-.997**	-.566	-.997**	-.996**	-.984**	.996**	.998**	.990**	.992**
کوئرستین	.967**	.993**	-.997**	-.993**	.998**	.991**	1	-.998**	-.547	-.998**	-.997**	-.986**	.997**	.983**	.996**	1.000**
درجه حرارت	-.970**	-.998**	.999**	.996**	-.994**	-.997**	-.998**	1	.551**	1.000**	.999**	.990**	-.998**	-.991**	-.997**	-.998**
اسیدیته	-0.43	-0.549	0.521	0.617	-0.538	-0.566	-0.547	.551**	1	.551**	.524**	.441**	-.527**	-.567**	-.530**	-.542**
هدایت الکتریکی	-.970**	-.998**	.999**	.996**	-.994**	-.997**	-.998**	1.000**	.551**	1	.999**	.990**	-.998**	-.991**	-.997**	-.998**
نیترات	-.976**	-.998**	1.000**	.993**	-.993**	-.996**	-.997**	.999**	.524**	.999**	1	.994**	-.997**	-.990**	-.996**	-.997**
نیتریت	-.987**	-.988**	.995**	.975**	-.983**	-.984**	-.986**	.990**	.441**	.990**	.994**	1	-.990**	-.980**	-.986**	-.988**
فسفات	.977**	.993**	-.997**	-.991**	.990**	.996**	.997**	-.998**	-.527**	-.998**	-.997**	-.990**	1	.992**	.992**	.998**
فسفر	.973**	.990**	-.988**	-.989**	.971**	.998**	.983**	-.991**	-.567**	-.991**	-.990**	-.980**	.992**	1	.980**	.984**
سولفات	.955**	.997**	-.995**	-.993**	.996**	.990**	.996**	-.997**	-.530**	-.997**	-.996**	-.986**	.992**	.980**	1	.995**
آهن	.971**	.992**	-.998**	-.993**	.997**	.992**	1.000**	-.998**	-.542**	-.998**	-.997**	-.988**	.998**	.984**	.995**	1

* معنی دار در سطح ۵درصد ** معنی دار در سطح ۱ درصد و بدون ستاره عدم وجود اختلاف معنی دار

پیوست ۲ : همبستگی بین ترکیبات فنولی و فعالیت های آنتی اکسیدانی با فاکتورهای محیط آب در عصاره جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*)

پارامترها	فنول	فلاونوئید	دی‌فنیل- پیکریل- هیدرازیل	نیتریک اکسید	گالیک اسید	کوماریک اسید	کوئرستین	درجه حرارت	اسیدیته	هدایت الکتریکی	نیترات	نیتریت	فسفات	فسفر	سولفات	آهن
فنول	1	-.991**	-.992**	-.771	.978**	.996**	.995**	.994**	-.601	-.994**	-.994**	-.962**	-.992**	-.979**	-.852*	-.981**
فلاونوئید	-.991**	1	.994**	.810	-.981**	-.998**	-.999**	-.998**	.519	.998**	.990**	.982**	.998**	.992**	.838*	.956**
دی‌فنیل- پیکریل- هیدرازیل	-.992**	.994**	1	.780	-.987**	-.994**	-.998**	-.999**	.532	.999**	.994**	.987**	.999**	.991**	.876*	.971**
نیتریک اکسید	-.771	.810	.780	1	-.843*	-.793	-.791	-.789	.058	.789	.787	.766	.793	.773	.571	.741
گالیک اسید	.978**	-.981**	-.987**	-.843*	1	.976**	.983**	.986**	-.438	-.986**	-.991**	-.968**	-.984**	-.964**	-.887*	-.976**
کوماریک اسید	.996**	-.998**	-.994**	-.793	.976**	1	.999**	.997**	-.564	-.997**	-.989**	-.975**	-.997**	-.991**	-.829*	-.961**
کوئرستین	.995**	-.999**	-.998**	-.791	.983**	.999**	1	1.000**	-.543	-1.000**	-.993**	-.983**	-1.000**	-.983**	-.852*	-.966**
درجه حرارت	.994**	-.998**	-.999**	-0.789	.986**	.997**	1.000**	1	-.533**	-1.000**	-.995**	-.986**	-1.000**	-.991**	-.865**	-.969**
اسیدیته	-0.601	0.519	0.532	0.058	-0.438	-0.564	-0.543	-.533**	1	.533**	.528**	.450**	.527**	.522**	.387**	.582**
هدایت الکتریکی	-.994**	.998**	.999**	0.789	-.986**	-.997**	-1.000**	-1.000**	.533**	1	.995**	.986**	1.000**	.991**	.865**	.969**
نیترات	-.994**	.990**	.994**	0.787	-.991**	-.989**	-.993**	-.995**	.528**	.995**	1	.971**	.992**	.972**	.895**	.986**
نیتریت	-.962**	.982**	.987**	0.766	-.968**	-.975**	-.983**	-.986**	.450**	.986**	.971**	1	.988**	.991**	.868**	.926**
فسفات	-.992**	.998**	.999**	0.793	-.984**	-.997**	-1.000**	-1.000**	.527**	1.000**	.992**	.988**	1	.993**	.855**	.962**
فسفر	-.979**	.992**	.991**	0.773	-.964**	-.991**	-.983**	-.991**	.522**	.991**	.972**	.991**	.993**	1	.824**	.930**
سولفات	-.852*	.838*	.876*	0.571	-.887*	-.829*	-.852*	-.865**	.387**	.865**	.895**	.868**	.855**	.824**	1	.908**
آهن	-.981**	.956**	.971**	0.741	-.976**	-.961**	-.966**	-.969**	.582**	.969**	.986**	.926**	.962**	.930**	.908**	1

* معنی دار در سطح ۵درصد ** معنی دار در سطح ۱ درصد و بدون ستاره عدم وجود اختلاف معنی دار

آنالیز واریانس چند متغیره نشان داد که بعضی از فاکتور های آب بر میزان فنول کل، فلاونوئید کل، اسید گالیک، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های کلادوفورا (*Cladophora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها تأثیر معنی داری از لحاظ آماری دارند (P<۰۵/۰). بررسی جداول ضرایب همبستگی (پیوست های ۱ و ۲) بین زوج صفات نشان می دهد که درجه حرارت و محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Clado-phora*) همبستگی منفی (به ترتیب: -۹۷/۰ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۹/۰ =r) و مقدار درجه حرارت محیط با محتوای فنولی، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) همبستگی مثبت (به ترتیب، ۹۹/۰ =r، ۰۰/۱= r، ۹۹/۰ =r، ۹۸/۰ =r) و معنی دار و با فلاونوئید همبستگی منفی (-۹۹/۰ =r) و معنی دار در سطح ۵ درصد مشاهده گردید. مقدار اسیدیته آب با میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Clado-phora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) رابطه معناداری را نشان نداد. هدایت الکتریکی با محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Clado-phora*) همبستگی منفی (به ترتیب: -۹۷/۰ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۹/۰ =r) و معنی دار و با محتوای فنولی، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spir-ogyra*) همبستگی منفی (به ترتیب: -۹۹/۰ =r، -۰۰/۱ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۸/۰ =r) و هدایت الکتریکی با فلاونوئید همبستگی مثبت (۹۹/۰ =r) و معنی دار و مقدار نیترات موجود در آب با محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Clado-phora*) همبستگی منفی (به ترتیب: -۹۷/۰ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۹/۰ =r) و معنی دار در سطح ۵ درصد گزارش شد. نیترات با محتوای فنولی، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spiro-gyra*) همبستگی منفی (به ترتیب: -۹۹/۰ =r، -۹۹/۰ =r، -۹۸/۰ =r، -۰ =r) و معنی دار و میزان نیترات با فلاونوئید همبستگی مثبت (۹۹/۰ =r) و معنی دار در سطح ۵ درصد مشاهده شده است. غلظت فسفات موجود در آب با محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) همبستگی مثبت (به ترتیب: ۹۷/۰ =r، ۹۹/۰ =r، ۹۹/۰ =r، ۹۹/۰ =r، ۹۹/۰ =r) و در عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spi-rogyra*) میزان فسفات با محتوای فنولی،

گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی منفی (به ترتیب: r= -۰۰/۱، r= -۹۹/۰، r= ۰، r= -۹۸/، r= -۹۹/۰) و با فلاونوئید همبستگی مثبت (r=۹۹/۰) و معنی دار در سطح ۵ درصد وجود دارد. میزان فسفر موجود در آب با ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) همبستگی مثبت (به ترتیب: r= ۹۷/۰، r= ۹۸/۰، r= ۹۹/۰، r= ۹۷/۰، r= ۹۹/۰) و در عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) غلظت فسفر و محتوای فنولی، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی منفی (به ترتیب: r= -۹۷/۰، r= -۹۶/، r= -۹۸/۰، r= -۹۹/۰، r= ۰) و با فلاونوئید همبستگی مثبت (r=۹۹/۰) و معنی دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد. غلظت آهن موجود در آب با میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی عصاره های جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) همبستگی مثبت (به ترتیب: r= ۹۷/۰، r= ۰۰/۱، r= ۹۹/۰، r= ۹۹/۰، r= ۹۹/۰) و در عصاره های جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) مقدار آهن و محتوای فنولی، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین همبستگی منفی (به ترتیب: r= -۹۸/۰، r= -۹۷/، r= -۹۶/۰، r= -۹۶/۰، r= ۰) و با فلاونوئید همبستگی مثبت (r=۹۵/۰) و معنی دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری

ترکیبات فنولی، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنوان متابولیتهای ثانویه را تشکیل میدهند که در پاسخ به استرسهای محیطی ایجاد میشود. این ترکیبات به دلیل داشتن گروههای هیدروکسیل، توانایی خنثی سازی رادیکالهای آزاد را داشته و می توانند به عنوان دهنده با الکترون یا هیدروژن عمل نمایند .(Fukumoto, 2000) افزایش ترکیبات فنول تام خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتر میشود. ترکیبات فنولی با وزن مولکولی زیاد توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکالهای آزاد را دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه های آروماتیک و ماهیت گروههای جابه جا شونده هیدروکسیل دارد.(Lagouri, 1996) در تمام مراحل رشد گیاهان، یک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی فعال می‌باشد. عمل این آنتی‌اکسیدان‌ها متفاوت است و به طور گسترده با چندین فاکتور مثل مراحل بلوغ، شرایط آب و هوایی، بخش‌های مورد استفاده از گیاه، شرایط برداشت و ذخیره سازی تغییر می‌کند (Mejia et al., 1988). به نظر می رسد تولید متابولیت های ثانویه تحت تأثیر شرایط محیطی گیاه باشد. بنابراین شناسایی شرایط مناسب جهت تولید متابولیت های خاص گیاه می تواند در افزایش تولید این متابولیت ها در محیط های کشت مصنوعی مؤثر باشد (Becerro, and Paul, 2004; Ibrahim et al., 2011). ترکیبات ثانویه گیاهان طیف وسیعی از عملکردهای بیولوژیک را نشان می دهند.

بنابراین شناسایی یک یا چند عامل زیست محیطی تنظیم کننده سنتز ترکیبات ثانویه در گیاهان بسیار سخت است(Stamp, 2003). از آنجا که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گوناگون درشیشه (in vitro) از طریق سازوکارهای مختلفی عمل می-کنند واضح است که تنها یک روش نمی‌تواند پیش بینی جامعی از تاثیر تمام پارامترهای درگیر در خصوصیت آنتی‌اکسیدانی ارائه دهد (Aruoma, 2003). بنابراین، در این تحقیق از روشهای سنجش متفاوت برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها استفاده گردید. این روشهای سنجش، در خصوصیاتی مانند سوبسترا، شرایط واکنش، روش‌های کمی کردن داده‌ها و غیره با یکدیگر متفاوتند (Conforti et al., 2007). بسته به روش‌های به کار برده شده، عصاره‌های گیاهی در دوره‌های مختلف توانایی آنتی-اکسیدانی متفاوتی را نمایش دادند.

طبق نتایج تحقیق حاضر در جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) میانگین ترکیبات فنولی، فلاونوئید، گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین در منطقه مصب بیشتر بود و میانگین IC۵۰ آزمون DPPH، نیتریک اکساید و شلاته دهندگی آهن در منطقه دریا بیشترین بوده. بطور کلی جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) در منطقه مصب رودخانه فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری را در صفات مختلف از خود نشان داده است. در جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) میانگین ترکیبات فنولی، شلاته دهندگی، اسید گالیک، کوماریک و کوئرستین در مزرعه شالیزاری بیشتر بود و میانگین فلاونوئید، IC۵۰ آزمون DPPH و نیتریک اکساید در منطقه دامداری بیشتر بود. بنابراین جلبک مزرعه شالیزاری فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری از نظر میزان ترکیبات فنولی، اسید گالیک، کوماریک اسید، کوئرستین، IC۵۰ آزمون DPPH و نیتریک اکساید برخوردار بوده و منطقه پساب دامداری از نظر میزان فلاونوئید و IC۵۰ آزمون شلاته دهندگی بهتر بوده است (شکل ۱، ۲ و ۳). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) در مصب رودخانه میزان فنول و فلاونوئید و ترکیبات فنولی گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین بیشتری نسبت به دریا برخوردار بود. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری را در آزمون های به دام اندازی رادیکال DPPH، نیتریک اکساید، شلاته دهندگی آهن II و احیا کنندگی آهن III از خود نشان داد. جلبک اسپیروژیر (*Spirogyra*) موجود در منطقه مزرعه شالیزاری از میزان فنول و ترکیبات فنولی گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین بیشتری نسبت به پساب دامداری برخوردار بود و فعالیت های آنتی اکسیدانی بهتری را در آزمون های به دام اندازی رادیکال DPPH، نیتریک اکساید و احیاکنندگی III از

خود نشان داد. بنابراین ترکیبات فنولی می تواند مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های استخراج شده باشند که چنین نتایجی قبلا هم گزارش شد (Josuttis et al., 2012; Ghasemi et al., 2009) (Ebrahimzadeh et al., ۲۰۰۹). در این مطالعه اختلاف معنی داری بین محتوای فنولی و فلاونوئیدی نمونه ها در مناطق مختلف مشاهده شد. آزمون عصاره ها، فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی را در بعضی از تست ها نشان داد. نتایج نشان می دهد که بین فاکتورهای آب و میزان ترکیبات آنتی اکسیدان فنولی در عصاره های جلبک کلادوفورا (*Clado-phora*) و اسپیروژیر (*Spirogyra*) رابطه معناداری وجود دارد (پیوست های ۱ و ۲). این رابطه به این مفهوم می باشد که سنتز ترکیبات فنولی می تواند تحت تاثیر عوامل مشترکی قرار داشته باشد. هدایت الکتریکی با ترکیبات فنولی در عصاره های هر دو نوع جلبک همبستگی منفی را نشان داد، بدین معنی که با کم بودن میزان هدایت الکتریکی، میزان ترکیبات فنولی افزایش می یابد (McIntyre and Wheater, 2004). هدایت الکتریکی تعیین کننده غلظت املاح محلول در آب می باشد و در ارتباط با آنیون ها و کاتیون های موجود در آب است (Lucassen, 2004) . هر چه میزان یونهایی نظیر نیترات و فسفات در آب کمتر باشد، فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می یابد. که جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) مصب و اسپیروژیر (*Spirogyra*) شالیزار با هدایت الکتریکی کمتر، از میزان ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی بهتری برخوردار بودند. نیترات اکسیده ترین شکل نیتروژن است که در سیستم های طبیعی یافت می شود. تجمع نیترات می تواند ناشی از انتشار آب های کشاورزی به علت مصرف بیش از حد کود های نیتراتی باشد و یا آلودگی نقطه ای از فاضلاب های انسانی که به درستی دفع و فرآوری نشده اند و یا پساب کارخانه ها باشد که موجب آلوده شدن آب می شود (Manassaram et al., 2007). به همین دلیل با بالا بودن میزان نیترات و نیتریت موجود در پساب دامداری، این آب بسیار آلوده بوده و از فعالیت آنتی اکسیدانی کمی در مقایسه با سایر نمونه ها برخوردار بود و مصب رودخانه هم با کمترین میزان نیترات و نیتریت فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری داشت که همبستگی منفی بین نیترات و نیتریت موجود در آب با میزان ترکیبات فنولی گزارش شد. اثر فسفات بر آب نتیجه انتشار وسیع آن به محیط به دلیل معدن کاری و یا کشت و زرع می باشد. در هنگام تصفیه آب معمولا فسفات از بین نمی رود، بنابر این می تواند تا مسافت زیادی توسط آب های سطحی انتشار یابد. (Stepien and Klobus, 2005) با افزایش میزان فسفات در محیط، رشد جلبک ها هم افزایش می یابند(Zhang and Prepas,

1996) . در این تحقیق رابطه معناداری بین میزان فسفات آب و فعالیت آنتی اکسیدانی جلبک ها مشاهده شد. بین درجه حرارت و ترکیبات فنولی همبستگی منفی نشان داده شد. بدین معنی که در دماهای پایین میزان ترکیبات فنولی افزایش می یابد. درجه حرارت پایین همراه با شدت نور، استرس فتواکسی داتیو را با محدود کردن آنزیم های فتوسنتزی افزایش می دهد در نتیجه ترکیبات فنولی به عنوان محافظت کننده نوری افزایش می یابند(Close and Mc Arthur, 2002) . غلظت سولفات با میزان سدیم، پتاسیم و کلر در آب رابطه مستقیم دارد. سولفات ها در آب هایی که غلظت نمک آن ها بالاتر است و یا زمین هایی که لایه های آن ارتباط با لایه های زیر زمین دارند، بیشتر دیده می شود (Zhang, 2001).در این پژوهش بین میزان سولفات و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های مصب رودخانه و دریا همبستگی مثبت و معنی دار بهتری در سطح ۱ درصد در مقایسه با سایر نمونه ها مشاهده شد که علت آن می تواند افزایش غلظت نمک و شوری آب این مناطق نسبت به نمونه های دیگر باشد.

پیش از این همبستگی بین فلاونوئیدها و فعالیت آنتی اکسیدانی در جلبکها گزارش شده است (Athukorala et al., 2006; Jimenez-Escrigh et al., 2001) وجود همبستگی مثبت بین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نیز با نتایج مطالعات Bou-ba و همکاران (۲۰۱۰) و Chai and Wong (۲۰۱۲) همخوانی دارد. Wang و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی جلبک اسپیرولینا فعالیت بالای عصاره ها را علاوه بر وجود فلاونوئید به بتاکاروتن، ویتامین A و آلفا توکوفرول نسبت دادند. پژوهش ها همبستگی قوی مثبتی بین مقدار فنول و توان آنتی اکسیدانی عصاره جلبکها نشان داده اند(Luo et al., 2010; Liu et al., 2011; Horincar et al., 2011) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که شرایط زیست محیطی و اقلیمی در مناطق مختلف تأثیر معنی داری را در محتوای ترکیبات بیواکتیو و فعالیت آنها دارد. تولید متابولیت های ثانویه درگیاهان تحت تأثیر عوامل محیطی و ژنتیکی قرار دارد. به نظر می رسد تأثیر عوامل ژنتیکی قویتر از عوامل محیطی باشد .(Martz et al., 2010) گیاهان و جلبک ها با شیوه های متفاوتی در مقابل تنش های محیطی از خود واکنش نشان می دهند. عوامل محیطی نقش مهمی در تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان دارند. شرایط اکولوژیکی و زیست محیطی، مواد مغذی، درجه حرارت، اسیدیته، غلظت مواد آلی و معدنی از جمله عوامل محیطی مؤثر بر تولید ترکیبات فنولی در گیاهان و جلبک ها می باشند. بیشتر جلبک ها با قرار گرفتن در

برابر این عوامل محیطی استرس زا تولید ترکیبات فنولی را در خود افزایش می دهند و از آنجایی که ترکیبات فنولی یکی از انواع آنتی اکسیدان های مهم طبیعی به شمار می روند و با توجه به کاربردهای متنوع آنها برای بشر دارای اهمیت می باشند.

سپاسگزاری

نگارندگان، از گروه زیست شناسی دانشگاه مازندران و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی ساری به خاطر همکاری در اجرای این پژوه، صمیمانه قدردانی می نمایند.

منابع

صنوبری، ز.، و جعفری، ن. (۱۳۹۱). ارزیابی محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی جلبک کلادوفورا (*Cladophora*) گلومراتا و اسپیروژیر (*Spirogyra*) ولگاریس. هفدهمین کنفرانس سراسری و پنجمین کنفرانس بین المللی زیست شناسی ایران. دانشگاه شهید باهنر کرمان.

لونی، ا.، حسنوند، ع.، و یخچی، و. (۱۳۹۱). بررسی خاصیت دارویی و آنتی اکسیدانی جلبک ها راه کاری مناسب برای بهره برداری از منابع طبیعی و آب های شور. همایش منطقه ای توسعه پایدار منابع طبیعی غرب کشور.

Aruoma, O. (2003). Methodological consideration for characterization potential antioxidant action of bioactive components in plant foods. Mutation Research, 524, 9-20.

Athukorala, Y., Kim, K.N. & Jeon, Y.J. (2006). Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydroliy sate from brown algae, Ecklonia cava. Food and Chemical Toxicology, 44, 1065-1074.

Becerro, M.A., & Paul, V.J. (2004). Effects of depth and light on secondary metabolites production and cyanobacterial symbionts of the sponge Dyside agranulose. Marine Ecology Progress Serie, 280, 115-128.

Brown, M.R., Jeffry, S.W., & Garloud, C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. CSIRO Marine laboratory, Report 205, 1-44.

Bouba, A., Njintang, Y.N., Scher, J. & Mbofung, C.M.F. (2010). Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. Agriculture and Biology Journal of North America, 1(3), 213-224.

Chai, T.T. & Wong, F.C. (2012). Whole -plant profiling of total phenolic and flavonoid contents, antioxidant capacity and nitric oxide scavenging capacity of Turnera subulata. Journal of Medicinal Plants Research, 6(9), 1730-1735.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in proplis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10, 178-182.

Close, D.C., & Mc Arthur, C. (2002). Rethinking the role of many plant phenolics protection from photo damage not herbivores. Oikos, 99, 166–172.

Conforti, F., Statti, G. A. & Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (Capsicum annuum var. acuminatum L.) in relation to maturity stage. Food Chemistry, 102, 1096–1104.

El-Baky, A., El-Baz, H.H. & El-Baroty, F.K. (2009). Natural preservative ingredient from marine alga Ulva lactuca L. International Journal of Food Science and Technology, 44, 1688-1695.

Fukumoto, L.R. & Mazza, G. (2000(. Assessing antioxidant and proxidant activities of phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 3597-3604.

Ghasemi, K., Ghasemi, Y. & Ebrahimzadeh, M.A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 22(3), 277-281.

Hanna, H., El-Baky, A., Hussein, M.M. & El-Baroty, G. (2008). Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 7, 2812-2832.

Horincar, V.B., Parfene, G. & Bahrim, G. (2011). Evaluation of bioactive compounds in extracts obtained from three Romanian marine algae species. Romanian Biotechnological Letters, 16(6), 71- 78.

Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A. & AbdulRahman, Z. (2011). The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in Labisia punila Benth. under high CO2 and nitrogen fertilization. Molecules, 16, 162-174.

Jimenez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Pulido, R. & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 530-534.

Josuttis, M., Carlen, C., Crespo, P., Nestby, R., Toldam-Andersen, T.B., Dietrich, H. & Kruger, E. (2012). A comparison of bioactive compound of straw berry fruit from Europe affected by genotype and latitude. Berry Research, 2(2), 73-93.

Lagouri, V. & Boskou, D. (1996). Nutrient antioxidants in oregano. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 47, 493-497.

Liu, C.C., Zhao, G.L., Li, Y.N., Ding, Z.P., Liu, Q.G. & Li, J.L. (2011). Contribution of phenolics and flavonoids to antioxidant activity of ethanol extract from Eichhornia crassipes. Advanced Material Research, 156-157, 1372-1377.

Luo, H.Y., Wang, B., Yu, C.G., Qu, Y.L. & Su, C.L. (2010). Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. Journal of Medical Plants Research, 4(18), 2557 -2565.

Lucassen, E. (2004). High groundwater nitrate concentrations inhibit eutrophication of sulphate rich freshwater wetlands. Biogeochemistry, 67 (2), 249-267.

Manassaram, D.M., Backer, LC., Moll, DM. (2007). A review of nitrates in drinking water: maternal exposure and adverse reproductive and developmental outcomes. Ciência & Saúde Coletiva, 12(1), 153-63.

Martz, F., Jaakola, L., Julkunen-Tiitto, R. & Stark, S. (2010). Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (Vaccinium myrtillus) leaves in northern Europe following foliar development and along environmental gradients. Chemical Ecology, 36, 1017- 1028.

McIntyre, N.R. & Wheater, H.S. (2004). A tool for risk based management of surface water quality. Environmental Modeling and Software, 19 (12), 1131-1140.

Mejia, L. A., Hudson, E., Gonzalez de Mejia, E. and Vasquez, F. (1988). Carotenoid content and vitamin A activity of some common cultivars of Mexican peppers (Capsicum annuum) as determined by HPLC. Journal of Food Science, 53, 1448-1451.

Nerg, A., Kainulainen, P., Vuorinen, M., Hanso, M., Holopainen, J.K. & Kurkela, T. (1994). Seasonal and geographical variation of terpenes, resin acids and total phenolics in nursery grown seedlings of Scots pine (Pinus sylvestris L.). New Phytologist, 128, 703-713.

Ordonez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A. & Isla, M.I. (2006). Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) Swartz extracts. Food Chem., 97, 452–458.

Plaza, M., Cifuentes, A. & Ibanez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae .Trends in Food Science and Technology, 19, 31–39.

Rania, M.A. & Hala, M.T. (2008). Antibacterial and antifungal activity of Cynobacteria and green microalgae evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of Spirulina platensis. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 3(1), 22–31.

Singh, S., Shimada, K. & Singh, R.B. (2002). In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. Food Reviews International, 24, 392-415.

Slinkard, K. & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.

Stamp, N. (2003(. Out of the quagmire of plant defence hypotheses. Quarterly Review of Biology, 78, 23–55.

Stepien, P. & Klobus, G. (2005). Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. Physiologia Plantarum, 125, 31-40.

Velioglu, Y.S. & Mazza, G. (1991). Characterization of flavonoids in petals of Rosa damascena by HPLC and spectral analysis, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 463-467.

Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J. & Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of Spirulina platensis extracts by supercritical carbon dioxide extraction. Food

Chemistry, 105(1), 36-41.

Zhang, M. (2001). Information-Stataistics evaluation on the effects of ground water buried depth to upper soil and groundwater salinity, China Postdoctoral Preceding Science Press, Beijng, China.

Zhang, Y. & Prepas E. (1996). Regulation of the dominance of planktonic Diatoms and Cyanobacteria in four eutrophic hard water lakes by nutrients water column stability and temperature. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53, 621-633.