

استخراج و شناسایی ترکیبات موجود در توتیای دریایی (*Echinodermata mathaei*) به روش سیال فوق

بحرانی

طاهره ناجی*، مهناز قمی و صدیقه باقری

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۳/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۷/۱۶

چکیده

این تحقیق با هدف شناسایی ترکیبات موجود در گونه توتیای دریایی با نام علمی *Echinodermata mathaei* انجام گرفت. منطقه مورد مطالعه در آب های زیر جزرو مدی بندر لنگه در موقعیت جغرافیایی با طول شرقی $53^{\circ}54'$ و عرض شمالی $32^{\circ}26'$ بود. نمونه برداری در محدوده ی عمق ۱۵-۱۰ متری و توسط غواص صورت گرفت. برای شناسایی اجزای تشکیل دهنده این جاندار، پنج توتیای دریایی با میانگین طولی $1 \pm 8/5$ سانتی متر و عرضی 1 ± 7 سانتی متر و وزنی معادل $10 \pm 66/680$ گرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از آماده سازی، نمونه ها توسط دستگاه سیال فوق بحرانی (مدل Suprex MPS/225 ساخت شرکت Pittsburgh آمریکا) استخراج گشته و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (ساخت شرکت Hewlett Packard مدل ۵۸۹۰) متصل شده با اسپکتروسکوپی جرمی (مدل ۵۹۷۰ ساخت شرکت Hewlett Packard) شناسایی شد. ترکیبات شناسایی شده در این توتیا با روش SFE تحت شرایط بهینه شامل ۲/۸۵ درصد ان هگزا دکانوئیک اسید متیل استر، ۱/۹ درصد اکتا دکانوئیک اسید، ۳/۰۳ درصد سیکلوپروپانوئیک اسید، ۷۷/۴ درصد کلسترول، ۶/۴۵ درصد ارگوستا ۵ و ۲۵ دی ان ۳ ال و ۵/۱۵ درصد فوکوسترول می باشند، که در میان این ترکیبات fucosterol دارای خواص آنتی اکسیدانی، n-Hexadecanoic acid دارای خواص ضد التهابی و Ergosta-۵,۲۲-dien-۳-ol دارای خواص کمک به جوانه زنی می باشد.

واژگان کلیدی

Echinodermata mathaei، استخراج، روش سیال فوق بحرانی

* نگارنده پاسخگو: naji_t@iaups.ac.ir

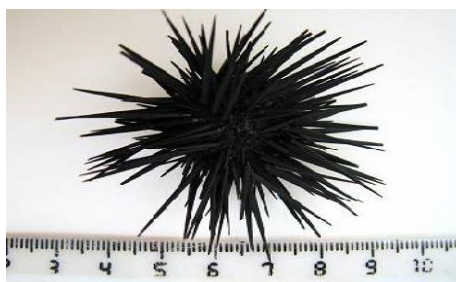
مقدمه

در روند کشف داروهای جدید برای درمان بیماری‌ها، کارایی بالای ماده‌ی موثره همواره مورد توجه بشر بوده است. منابع زنده طبیعی دارای نقش به‌سزایی در تامین این مواد است. ۸۰ درصد از موجودات زنده در دریاها و اقیانوس‌ها زندگی می‌کنند. دریاها و اقیانوس‌ها از تنوع بیولوژیکی و شیمیایی سرشاری برخوردار هستند. تعداد ترکیبات جدا شده از میکروارگانیسم‌های دریایی در سال ۲۰۱۰، حدود ۱۰۰۳ عدد می‌باشد (Blunt, ۲۰۱۲). این در حالیست که هزاران ترکیب شیمیایی خاص تنها از تعداد کمی از این موجودات بدست آمده است (Gu et al., ۲۰۱۱). در میان جاندارانی که در دریا زیست می‌کنند می‌توان به توتیای دریایی اشاره کرد. توتیای دریایی مدلی عالی در علم پزشکی و سم‌شناسی می‌باشد. این جانوران دارای ترکیباتی هستند که دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (David et al., ۲۰۰۲). علاوه بر این، در بدن این جاندار ماده‌ای به نام سولفات روی تولید می‌گردد که سبب تاثیرات سمی بر روی سیستم عصبی می‌گردد (Pettit et al., ۱۹۸۱). نوعی از توتیای دریایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، گونه *Echinodermata mathaei* است که بیشترین درصد جمعیت شاخه‌ی خارپوستان در سواحل بندر لنگه، قشم و همچنین روستاهای جنوبی ایران را تشکیل می‌دهد. از ویژگی‌های اکولوژیکی این منطقه می‌توان به سواحل فیزیکی پویا و مناطق دلتایی اشاره کرد که محل زندگی ۵ گونه شناخته شده از خارپوستان است. از گونه‌های غالب در این منطقه می‌توان، خیار دریایی، ستاره دریایی و توتیای دریایی را نام برد (محمدیان ۱۳۸۸).

مطالعاتی که تاکنون بر روی گونه *E. mathaei* انجام شده است به تاثیر سمیت فلزات بر روی لارو آن (ایزدی و همکاران، ۱۳۸۸)، روند توسعه و رشد (Pawson, ۲۰۰۷) و اندازه‌گیری مقادیر لپیدها و کربوهیدرات‌های این گونه پرداخته است (Lawrence, ۱۹۶۶). با توجه به اینکه اجزا و ترکیبات موجود در این گونه خاص در بندر لنگه تاکنون مورد ارزیابی قرار نگرفته، لذا این تحقیق به منظور شناسایی برخی از ترکیبات موجود در *Echinodermata mathaei* می‌باشد.

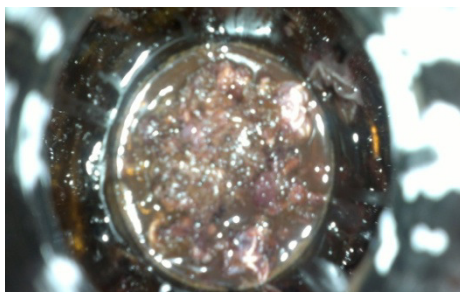
مواد و روش‌ها

تعداد ۵ نمونه از توتیای دریایی، به ترتیب با میانگین طول و عرض $۸/۵ \pm ۱$ و ۷ ± ۱ سانتی‌متر و وزنی معادل ۱۰ ± ۱ گرم (شکل ۱) از آب‌های زیر جزرومدی بندر لنگه در عمق ۱۵-۱۰ متری و محدوده‌ی جغرافیای طول شرقی ۳۱۲. ۵۳. ۵۴° و عرض شمالی ۳۲. ۷۳۹. ۲۶°، به هنگام جزر کامل، توسط غواص تهیه گردید.



شکل ۱- - *Echinodermata mathaei* جمع آوری شده از بندر لنگه

گونه *Echinodermata mathaei* جانوری خاردار، با پوسته‌ای نسبتاً سخت است که کم و بیش تخم مرغی شکل می‌باشد. خارهای اولیه‌ی این جاندار محکم بوده و دارای نوک تیز هستند. رنگ خار نمونه‌های زنده معمولاً ارغوانی مایل به سیاه و گاهی قهوه‌ای یا سبز است. جهت تهیه عصاره توتیا به صورت پودر، ابتدا با استفاده از اسکالپل خارهای توتیا جدا گشته و سپس طول و عرض و وزن آن مجدداً اندازه‌گیری شد. طول و عرض و وزن نمونه‌ها پس از جدا نمودن خارها به ترتیب به 5 ± 1 سانتی متر، $4/5 \pm 1$ سانتی متر و $45/780 \pm 10$ گرم تغییر یافت. سپس عصاره‌ی حاصل از همه توتیاها شکل (۲) که دارای آب زیادی بودند، در بالونی ریخته شد و ۲۴ ساعت در فریزر -20 درجه سانتی گراد قرار گرفت، تا آب اضافی آنها منجمد گردد. در مرحله بعد بالون حاوی عصاره به داخل دستگاه فریز درایینگ (مدل ۲-۴ LSC Christ Alpha ساخت شرکت استرالیایی) انتقال یافت، دمای فریز درایینگ در -52 درجه سانتی گراد و فشار در $0/052$ بار قرار گرفت تا نمونه‌ها در این دما و فشار توسط خلا و سرما خشک گردیده و به پودر تبدیل شوند. سپس نمونه‌ها در دمای -18 درجه سانتی گراد در فریزر نگهداری، و بعد از دو روز توسط آسیاب خانگی به قطر تقریبی $0/5$ میلی متر آسیاب گردید (Garg et al., ۲۰۱۲).



شکل ۲- عصاره حاصل از *Echinodermata mathaei*

g $0/5$ از نمونه‌های آسیاب شده با دانه‌های شیشه‌ای به قطر ۱ میلی متر مخلوط و درون سل استخراج دستگاه سیال فوق بحرانی (مدل Suprex MPS/۲۲۵ ساخت شرکت Pittsburgh آمریکا) مجهز به پمپ سرنگی انتقال یافت. این استخراج در آزمایشگاه آنالیز دانشگاه شهید بهشتی انجام گرفت. در استخراج‌هایی که نیاز به استفاده از اصلاح‌گر بود، در حین پر کردن سل، حجم مورد نظر از متانول مستقیماً درون سل استخراج ریخته شد (Nemoto et al., ۱۹۹۷).

برای شروع فرآیند استخراج ابتدا شرایط مورد نظر شامل فشار، دما، زمان استخراج استاتیک و دینامیک مطابق جدول (۱) در دستگاه برنامه ریزی گردید. شیر ورودی سیال به پمپ باز و پس از پر شدن پمپ بسته شد. پس از

رسیدن سیال به فشار مورد نظر، شیر خروجی از پمپ باز و استخراج آغاز گردید. سیستم دارای دو موقعیت بارگیری و تزریق است. در زمان استاتیک سیستم در موقعیت بارگیری و در زمان دینامیک در موقعیت تزریق بود. سرعت جریان سیال خروجی با استفاده از پیچ قابل تنظیم فشارشکن در حدود $0/05 \pm 0/3$ میلی لیتر بر دقیقه تنظیم شد و مواد استخراج شده درون $0/1$ میلی لیتر n -هگزان در یک فلاسک با حجم 2 میلی لیتر جمع شدند. به منظور کاهش تبخیر مواد استخراج شده و افزایش کارایی جمع‌آوری، ظرف جمع‌کننده در طول زمان استخراج دینامیک درون حمام یخ قرار گرفت. پس از تبخیر n -هگزان در دمای محیط، بازدهی استخراج از توزین مواد باقی‌مانده به‌دست آمد. تحت شرایط بهینه $1/0$ میکرولیتر از نمونه‌ی استخراج شده در حجم معینی از n -هگزان با نسبت شکافته شدن (Split ratio) $1/10$ به دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل ۵۸۹۰ ساخت شرکت Hewlett Packard)، متصل شده با اسپکتروسکوپی جرمی (مدل ۵۹۷۰ ساخت شرکت Hewlett Packard) مجهز به آنالیزور چهارقطبی و ستون DB-۵ به طول 30 متر و قطر داخلی $0/25$ میلی متر تزریق و دمای محل تزریق در 250 درجه سانتی گراد تنظیم شد. در ابتدا ستون به مدت 3 دقیقه در دمای 60 درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس با سرعت 4 درجه سانتی گراد بر دقیقه از دمای 60 درجه سانتی گراد تا 300 درجه سانتی گراد افزایش پیدا کرد. طیف‌های جرمی با استفاده از منبع یون یونیزاسیون برخورد الکترون با انرژی 70 الکترون ولت به‌دست آمد.

(Biedermann *et al.*, ۲۰۰۲)

شناسایی ترکیبات استخراج شده با مقایسه‌ی طیف شکست جرمی آن‌ها با داده‌های استاندارد موجود در حافظه دستگاه طیف سنج جرمی صورت گرفت (Settle, ۱۹۹۷).

نتایج

نتایج بدست آمده از حجم اصلاحگر در دستگاه کروماتوگرافی گازی- اسپکتروسکوپی جرمی با روش سیال فوق بحرانی در جدول (۱) نشان می‌دهد که در شرایط بهینه استخراجی، فشار، دما، زمان استاتیک و زمان دینامیک به ترتیب برابر 350 اتمسفر، 45 درجه سانتی گراد، 20 دقیقه و 40 دقیقه بوده و اصلاح گر افزایش حجمی نداشته است. فهرست درصد ترکیبات شناسایی شده به همراه ترکیب درصدشان در جدول (۲) آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود فراوانی ترکیبات موجود در این جاندار به ترتیب به شرح زیر است:

n- Cyclopropanenonanoic acid < Fucosterol < Ergosta-۵, ۲۲-dien-۳-ol < Cholesterol
Octadecanoic acid < Hexadecanoic acid, methyl ester

هم‌چنین شکل (۳) کروماتوگرام ترکیبات استخراج شده از توتیا با روش سیال فوق بحرانی تحت شرایط بهینه را نشان می‌دهد. از آن جایی که اصلاح‌گر استفاده شده در این روش n- هگزان است، ترکیبات با توجه به حلالیت در n- هگزان در زمان‌های مختلفی از دستگاه خارج می‌گردند. هر چه انحلال مواد در n- هگزان بیشتر باشد، زمان خروج سریع‌تر خواهد بود.

جدول ۱- شرایط آزمایش و نتایج به‌دست آمده از حجم اصلاح‌گر در روش سیال فوق بحرانی

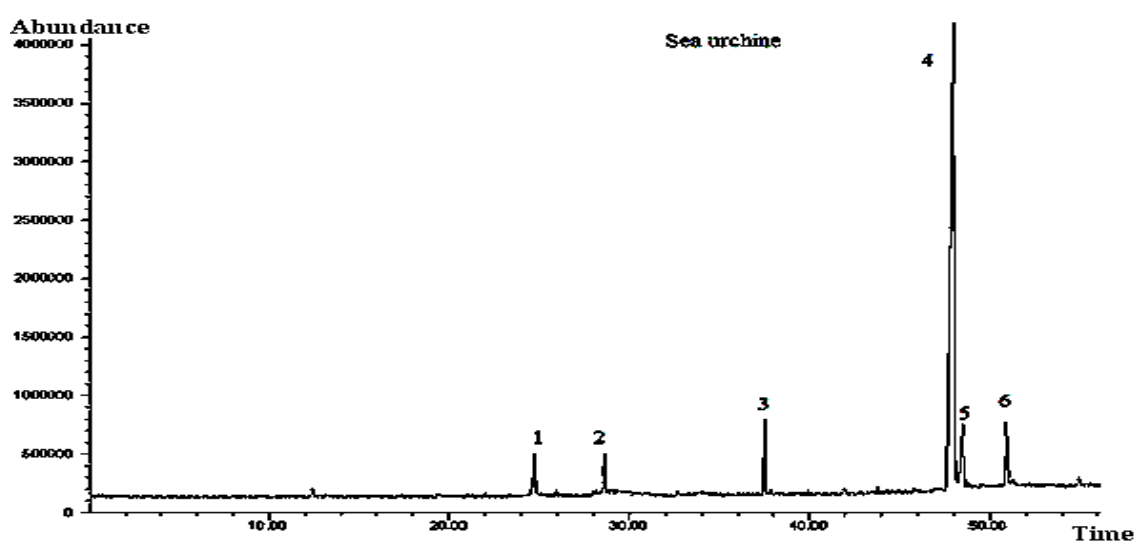
شماره	فشار (atm)	دما (°C)	زمان استاتیک (min)	زمان دینامیک (min)	حجم اصلاح‌گر (μl)
۱	۱۵۰	۳۵	۱۰	۲۰	۰
۲	۲۵۰	۳۵	۱۰	۲۰	۰
۳	۳۵۰	۳۵	۱۰	۲۰	۰
۴	۳۵۰	۵۵	۱۰	۲۰	۰
۵	۳۵۰	۶۵	۱۰	۲۰	۰
۶	۳۵۰	۴۵	۲۰	۲۰	۰
۷	۳۵۰	۴۵	۲۰	۳۰	۰
۸	۳۵۰	۴۵	۲۰	۴۰	۰
۹	۳۵۰	۴۵	۲۰	۴۰	۱۰۰
۱۰	۳۵۰	۴۵	۲۰	۴۰	۱۵۰

جدول ۲- ترکیبات شناسایی شده موجود در توتیا، گونه *Echinodermata mathaei* در منطقه زیر جزر و مدی

بندرلنگه با روش SFE

شماره	ترکیب	زمان بازداری (min)	درصد ترکیب
۱	n-Hexadecanoic acid, methyl ester	۲۴/۰۷	۲/۸۵
۲	Octadecanoic acid	۲۹/۴۲	۱/۹
۳	Cyclopropanenonanoic	۳۷/۵۶	۳/۰۳

acid			
۷۷/۴	۴۷/۸۸	Cholesterol	۴
۶/۴۵	۴۸/۵۲	Ergosta-۵,۲۲-dien-۳-ol	۵
۵/۱۵	۵۱	Fucosterol	۶
۳/۲	-	ترکیبات شناسایی نشده	۷



شکل ۳- کروماتوگرام ترکیبات استخراج شده از توتیا با گونه *Echinodermata mathaei* در منطقه زیر جزر و

مدی بندرلنگه با روش SFE.

بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که ۲/۸۵ درصد از ترکیبات استخراج شده توتیای دریایی گونه ی *E. mathaei* ماده n-Hexadecanoic acid است که حائز اهمیت می باشد. در مطالعه ای که توسط Aparna و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام گرفت نشان داده شد که n-Hexadecanoic acid به شیوه ای رقابتی سبب مهار فسفولیپاز A۲ می شود. از آن جایی که هیدرولیز باندهای استری غشا فسفولیپیدی توسط فسفولیپاز A۲ و آزاد شدن برخی از اسیدهای چرب انجام می گیرد، مهار عملکرد فسفولیپاز A۲ می تواند از التهاب جلوگیری کند. به همین علت در طب سنتی هند از روغن های غنی از n-Hexadecanoic acid برای درمان علائم رماتیسمی استفاده می شده است (Aparna, ۲۰۱۲). ترکیب دیگری که در *E. mathaei* موجود می باشد،

شامل Ergosta-۵, ۲۲- dien-۳-ol بوده که این ترکیب ۶/۴۵ درصد از ترکیبات موجود در این گونه را تشکیل می‌دهد. Ergosta-۵, ۲۲- dien-۳- ol برای اولین بار در ترشحات ریشه ی گیاه ماشک با نام علمی *Vicia sativa L.* یافت شده و در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Evidente و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که این ترکیب به خواص جوانه زنی گیاه کمک می‌کند و لذا می‌تواند به عنوان یک روش کنترلی جایگزین در القا جوانه زنی در برابر علف کش‌ها استفاده گردد (Evidente et al., ۲۰۱۱). استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان عامل مهمی در بیماری‌های انسانی باشد. لذا آنتی‌اکسیدان‌ها در علوم دارویی به شدت مورد مطالعه قرار می‌گیرند. fucosterol از جمله آنتی‌اکسیدان‌های خانواده ی استرول‌ها بوده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را با مهار رادیکال‌های آزاد و رادیکال هیدروکسیل اعمال می‌کند (کشاورزی و عاطفی، ۱۳۹۰). هم‌چنین در مطالعه ای که Yoo و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که فوکسترول (fucosterol) با سرکوب NF- κ B (Nuclear factor- κ B) و مهار مسیر P₃₈ MAPK (P₃₈ mitogen-activated protein kinase) سبب خواص ضد التهابی می‌گردد (Yoo et al., ۲۰۱۲). از آنجایی که فوکسترول ۵/۱۵ درصد از ترکیبات استخراج شده از *E. mathaei* را تشکیل می‌دهد، می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان و ضد التهاب در موارد مختلف بکار گرفته شود. Octadecanoic acid یک اسید چرب ۱۸ کربن است که نام عمومی آن، استئاریک اسید می‌باشد. این ماده ۱/۹ درصد از ترکیبات گونه ی مورد مطالعه را تشکیل می‌دهد. در مطالعه ای که Kelly و همکاران در سال ۲۰۰۱ به منظور مقایسه اسید استئاریک و پالمیتیک اسید (متداول ترین اسید چرب اشباع) بر روی میزان تجمع پلاکتی و افزایش کلسترول خون انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که استئاریک اسید هیچ گونه تأثیری بر روی کلسترول تام و میزان تجمع پلاکتی ندارد، اما پالمیتیک اسید سبب افزایش کلسترول تام شده و تجمع پلاکتی را زیاد می‌کند که در نتیجه این امر می‌تواند خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی را افزایش دهد. بنابراین می‌توان از استئاریک اسید به عنوان یک منبع چربی بدون عوارض قلبی-عروقی در رژیم غذایی استفاده نمود (Kelly et al., ۲۰۰۱). بی‌مهرگان دریایی نقش مهمی در رژیم غذایی انسان‌ها بازی می‌کنند و با توجه به مطالعاتی که تاکنون در مورد مواد تشکیل دهنده *E. mathaei* انجام شده، می‌توان از مواد این جاندار در بهبود بیماری‌های روماتیسمی (Singh et al., ۲۰۰۰)، نقرس (Memis et al., ۲۰۰۵)، بیماری التهابی روده (Bonner, ۲۰۰۲) و سایر بیماری‌هایی که در آن‌ها التهاب نقش مهمی را ایفا می‌کند، استفاده کرد. با توجه به تأثیرات فوکسترول در مهار رادیکال‌های آزاد می‌توان از آن به عنوان مواد آنتی‌اکسیدان در بیماری‌هایی همچون پارکینسون

(Moussaoui *et al.*, ۲۰۰۰)، مولتیپل اسکلروزیس (Gilgun-Sherki, ۲۰۰۴)، آلزایمر (Pitchumoni, ۱۹۹۸)، سرطان (Serafini, ۲۰۰۲) و حتی در لوازم آرایشی به عنوان محافظ در برابر اشعه UVB (Pelle, ۱۹۹۹) نیز استفاده کرد.

در میان ترکیبات استخراج شده از توتیای دریایی گونه *E. mathaei*، دو ترکیب فوکسترول و Hexadecanoic acid دارای خواص دارویی اند. همان‌طور که در قبل ذکر شد، این مواد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بالایی می‌باشند و از آن جایی که استفاده از داروهای ضد التهاب استروئیدی سبب بروز مشکلاتی مانند افزایش فشار خون و قند خون (Schäcke *et al.*, ۲۰۰۲) و مصرف داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی موجب عوارض شدید گوارشی و کلیوی (Rainsford, ۱۹۹۹) می‌گردند، شاید بتوان در آینده ای نزدیک از فوکسترول و Hexadecanoic acid به عنوان جایگزینی برای داروهای پر عارضه ی ضد التهاب استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی به انجام رسید که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

- ایزدی، س.، اشجع اردلان، آ.، حسین زاده صحافی، ه. و شگری، م. ۱۳۸۸. معرفی سه گونه از رده خارداران در منطقه بین جذر و مدی جنوب جزیره قشم، خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران. ۲۰(۱): ص. ۱۶۱-۱۶۴.
- کشاورزی، س. و عاطفی، ع. ۱۳۹۰. آشنایی با آنتی‌اکسیدان‌ها. مرکز تحقیقات خون، سرطان و ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران. ۱۸: ص ۱۶.
- محمدیان، ح. ۱۳۸۸. خارپوستان خلیج فارس و دریای عمان (شامل ستاره‌های دریایی، مارسانان، خارسانان و لاله‌وشان کشور). نشر شب پره. تهران.
- Aparna, V., Dileep, KV., Mandal, PK., Karthe, P., Sadasivan, C & Haridas, M. ۲۰۱۲. Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chemical Biology & Drug Design*, ۸۰(۳): ۴۳۴-۹.
- Ajdari, D., Hajirezaee, S and Ajdari, Z. ۲۰۱۱. Fish colonization of artificial reefs in the Persian Gulf (Bandar Lengeh-Iran): Reef designs and seasonal changes of fish abundance. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, ۳(۱۱): ۲۰۴-۲۱۲.

- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A & Grob, K. ۲۰۰۲. Two GC-MS Methods for the analysis of acrylamide in food stuffs. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, ۹۳: ۶۳۸-۶۵۲.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R A., Munro & Prinsep, M. R. ۲۰۱۲. Marine natural products. *Natural Product Reports*, ۲۹: ۱۴۴-۲۲۲.
- Bonner, G.F. ۲۰۰۲. Using COX-۲ inhibitors in IBD: anti-inflammatory inflame a controversy. *The American Journal of Gastro Enterology*, ۹۷ (۴): ۷۸۳-۷۸۵.
- David, J., Newman, M & Gordon, M. ۲۰۰۲. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical Trials. *Journal of Natural Products*, ۶۷: ۱۲۱۶-۱۲۳۸.
- Evidente, A., Cimmino, A., Fernández-Aparicio, M., Rubiales, D., Andolfi, A & Melck, D. ۲۰۱۱. Soyasapogenol B and Trans-۲۲-dehydrocampesterol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate broomrape seed germination. *Pest Management Science*, ۶۷(۸): ۱۰۱۵-۲۲.
- Garg, T., Chanana, A. & Joshi, R. ۲۰۱۲. Preparation of Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering using Freeze drying Technology. *IOSR Journal of Pharmacy*, ۲(۱): ۷۲-۷۳.
- Gilgun – Sherki, Y., Melamed, E. & Offen, D. ۲۰۰۴. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *Journal of Neurology*, ۲۵۱: ۲۶۱-۲۶۸.
- Gu, H., Yuan, J., Sun, Li., She, Z., Wu, Ju., Lan, X., Zhu, X., Lin, Y & Chen, S. ۲۰۱۱. Statistical research on marine natural products based on data obtained between ۱۹۸۵ and ۲۰۰۸. *Marine Drugs*, ۹(۴): ۵۱۴-۵۲۵.
- Settle, F.A. ۱۹۹۷. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. Prentice Hall. USA.
- Kelly, F.D., Sinclair, A.J., Mann, N.J., Turner, A.H., Abedin, L. & Li, D. ۲۰۰۱. A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *European Journal of Clinical Nutrition*, ۵۵: ۸۸-۹۶.

- Lawrence, J. M., Lawrence, A. L. & Giese, A. C. ۱۹۶۶. Role of the gut as a nutrient storage organ in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Physiological Zoology*, ۳۹: ۲۸۱-۲۹۰.
- Memis, D., Akalin, E. & Yucel, T. ۲۰۰۵. Analgesic-antipyretic and anti inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. *Journal of the Pancreas*, ۶(۴):۳۴۴-۳۴۷.
- Moussaoui, S., Obinu, M C., Daniel, N., Rebibaud, M., Blanchard, V & Imperato, A. ۲۰۰۰. The antioxidant ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, ۱۶۶(۲):۲۳۵-۲۴۵.
- Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M. & Saito, Y. Effect of extraction conditions and modifiers on the supercritical fluid extraction of ۸۸ pesticides. *Jornal of Chromatographic Science*, ۳۵:۴۶۷-۴۷۷.
- Pawson, D.L. ۲۰۰۷. Phylum Echinodermata. *Zootaxa*, ۱۶۶۸:۷۴۹-۷۶۴.
- Pelle, E. ۱۹۹۹. Protection against endogenous and UVB- induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photo dermatology, Photo immunology & Photo medicine* , ۱۵ (۳-۴):۱۱۵-۱۱۹.
- Pettit, G.R., Hasler, J.A ., Paull, K.D.& Herald,C.I. ۱۹۸۱. Antineoplastic agents. ۷۶. The sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Journal of Natural Products*, ۴۴(۶). ۷۰۱-۴.
- Pitchumoni, S.S. & Doraiswamy, P.M. ۱۹۹۸. Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society*, ۴۶(۱۲):۱۵۶۶-۱۵۷۲.
- Rainsford, KD. ۱۹۹۹. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti- inflammatory drugs (NSAIDs). *The American journal of medicine*, ۱۰۷ (۶):۲۷- ۳۵.
- Schäcke, H ., Döcke, W. D. & Asadullah, K. ۲۰۰۲. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics*, ۹۶(۱):۲۳-۴۳.
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A. & Ekström, AM. ۲۰۰۲. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, ۱۲۳(۴):۹۸۵-۹۹۱.

- Singh, G. ۲۰۰۰. Gastrointestinal complications of prescription and over-the-counter nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a view from the ARAMIS database. Arthritis, Rheumatism and Aging Medical Information System. American Journal of Therapeutics, ۷(۲):۱۱۵-۱۲۱.
- Yoo, M.S., Shin, J.S., Choi, H.E., Cho, Y.W., Bang, M.H., Baek, N.I & Lee, K.T. ۲۰۱۲. Fucosterol isolated from *Undaria pinnatifida* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via the inactivation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in RAW۲۶۴.۷ macrophages. Food Chemistry, ۱۳۵(۳):۹۶۷-۷۵.