(مقاله پژوهشی)

ارزیابی ترکیبات فنولی و فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس حاصل از روش‌های مختلف استخراج

پریسا دلفان[۱]، سید علی مرتضوی[۱*]، امیر حسین الهامی راد[۱]، مسعود شفافی زنوزیان[۱]

۱-گروه علوم وصنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی،سبزوار، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۰۹/۱۸

چکیده

در این پژوهش، عصاره ریز جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* با سه روش خیساندن، مایکروویو و فراصوت و با استفاده از دو حلال آب و اتانول تحت شرایط کنترل شده استخراج شد. ارزیابی میزان فلاونوئید، میزان فنول کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}) عصاره‌های حاصل به ترتیب بر اساس روش رنگی آلومینیوم کلرید، رنگ سنجی به روش فولین ـ سیوکالتو و جذب رادیکال DPPH (۲و ۲ دی فنیل ـ۱ـ پیکریل هیدرازیل) در سه تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که بین تکنیک‌های استخراج، روش فراصوت و بین دو حلال مورد استفاده، آب بهترین راندمان استخراج فنول کل، فلاونوئید و فعالیت رادیکال‌گیرندگی را داشت. مقادیر فنول کل، فلاونوئید و فعالیت رادیکال گیرندگی در روش فراصوت به ترتیب برابر با ۰/۳۶ ± ۲/۱۳ (mg/ml)، ۰/۳۵ ± ۳/۴ (mg/ml) و ۰/۳۵ ± ۰/۳۴ (µg/ml) تعیین گردید. به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که به کارگیری تکنیک فراصوت و حلال آب در مقایسه با پنج تیمار دیگر توانست بهترین کارایی را نشان دهد و در نهایت به عنوان تیمار بهینه انتخاب گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، *اسپیرولینا پلاتنسیس*، استخراج، ترکیبات زیست فعال.

[*]مسئول مکاتبات: morteza@um.ac.ir

۱- مقدمه

اکسیداسیون چربی‌ها، بدطعمی، کاهش کیفیت تغذیه‌ای و تشکیل ترکیبات سمی را به همراه داشته و خطری جدی برای مصرف‌کننده محسوب می‌شود (۲۰). یکی از راه‌های جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها، به کارگیری آنتی‌اکسیدان‌ها[1] در سیستم‌های غذایی می‌باشد(۳۱). بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) [2]، بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)[3] و ترشیاری بوتیل هیدروکینون (TBHQ)[4] از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی هستند که کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی به ویژه تکنولوژی روغن دارند، اما از سوی دیگر، استفاده از آن ها سلامتی انسان را تهدید می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که عمدتاً در گیاهان دارویی، میوه‌جات، سبزیجات و برخی منابع گیاهی دریایی وجود دارند در میان مصرف‌کنندگان طرفداران زیادی پیدا نموده‌اند و به نظر می‌رسد در پیشگیری از ابتلاء به تعدادی از بیماری‌ها حائز اهمیّت باشند (۳۳). گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات مؤثر مانند ترکیبات پلی‌فنولی[5]، تانن‌ها[6]، فلاونوئیدها[7] و اسیدهای فنولیک به عنوان منابع مهم آنتی-اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، ضدجهش‌زایی و ضدسرطانی دارند (۹). متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند ترکیبات فنولی دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت‌های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند (۲۱). امروزه تحقیقات گسترده‌ای به منظور به کارگیری منابع طبیعی آنتی‌اکسیدان به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در دست اجرا است (۱۹). ریز جلبک‌ها، میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده پروکاریوت یا یوکاریوتی هستند که طی فرآیند فتوسنتز، کربوهیدرات، پروتئین و چربی تولید می‌کنند (۲۶) و به عنوان منابع مفیدی از اسیدهای‌آمینه ضروری، ویتامین‌ها، رنگدانه‌های طبیعی و اسیدهای چرب ضروری امگا-۳ و به طور خاص امگا-۶، اسید لینولئیک، آراشیدونیک، لینولنیک و گاما- لینولنیک، ویتامین‌های مختلف (گروه B و اسید آسکوربیک) و مواد معدنی (پتاسیم، سدیم، منیزیم، آهن و کلسیم) می‌باشند که آنها را به عنوان مکمل‌هایی مناسب معرفی می‌کند. در میان گونه‌های شناخته شده ریزجلبک‌ها، *اسپیرولینا پلاتنسیس* گونه خوراکی رایج و بدون عوارض جانبی است. اسپیرولینا بعد از تأیید سازمان غذا و دارو (FDA)، به عنوان GRAS[8] معرفی گردید. خاصیت آنتی اکسیدانی اسپیرولینا عمدتاً به فیکوسیانین، بتاکاروتن و ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شود (۱۴). فرایند استخراج[9] یک مرحله بسیار مهم برای جداسازی و شناسایی ترکیبات فنولیک است. استخراج مواد آلی از مواد گیاهی به طور مستقیم به سازگاری مواد تشکیل‌دهنده به حلال[10] برمی‌گردد(۱۰). استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها، حلال و روش استخراج است. انتخاب حلال و روش استخراج به بخش‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن بستگی دارد (۳). انتخاب حلال مناسب برای هر دسته از ترکیبات گیاهی، بسیار مشکل است، زیرا همراه با این ترکیبات، مواد دیگری نیز وجود دارد که بر روی درجه حلالیت این مواد مؤثر می‌باشند (۲۹). استخراج ترکیبات فنولیک عموماً با استفاده از حلال انجام می‌گیرد که نوع و غلظت حلال، زمان و دما مهمترین پارامترها برای دستیابی به بالاترین میزان استخراج محسوب می‌شوند. حلالیت ترکیبات فنولیک بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون و برهم‌کنش آن ها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تأثیر معنی‌داری در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت‌ها وابسته به تمایل این ترکیبات به حلال مورد نظر برای عصاره‌گیری و به ویژه قطبیت آن است. علاوه بر این‌ها،

1- Antioxidants
2- Butylated Hydroxytoluene
3- Butylated Hydroxyanisole
4- Tertiary Butylhydroquinone
5- Polyphenols
6- Tannins
7- Flavonoids

8 - Generally Recognized as Safe
9 - Extraction
10 - Solvent

استخراج ترکیبات فنولیک از سایر ترکیبات بیولوژیک گیاه به وسیله روش‌های استخراج قدیمی مانند خیساندن، در بسیاری از موارد موجب هدر دادن حلال و زمان می‌شود (۱۱). امواج مایکروویو، تشعشعاتی الکترومغناطیسی با فرکانس حدود ۳۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگا هرتز می‌باشند که می‌توانند در داخل مواد بیولوژیکی نفوذ کرده و با مولکول‌های قطبی موجود در آن ها نظیر آب برهم‌کنش کرده و حرارت ایجاد نمایند. قسمت‌های داخلی سلول‌ها دچار حرارت‌دهی بیش از حد شده و در نتیجه، تخریب سلول‌ها گسترش می‌یابد که این امر موجب تسهیل خروج ترکیبات مؤثره و در نهایت، بهبود بازیافت آن‌ها می‌شود. بدین ترتیب، باعث افزایش قابل توجه راندمان فرآیند استخراج می‌گردد. علاوه بر این، مهاجرت یون‌های محلول، افزایش میزان نفوذ حلال به داخل بافت گیاهی و تسهیل رهایش ترکیبات داخل سلولی را در پی دارد (۱۲). تکنیک فراصوت یکی از جدیدترین و مؤثرترین روش‌های استخراج ترکیبات فنولیک و اجزاء مهم از گیاهان می‌باشد. به منظور استخراج مواد، غشاء سلول‌ها می‌بایست شکسته شود. حفره‌سازی فراصوت، نیروهای برشی را ایجاد می‌کند که دیواره‌های سلول را به‌طور مکانیکی می‌شکند و انتقال مواد را بهبود می‌بخشد. از این اثر در استخراج مواد از سلول‌ها استفاده می‌گردد. فراصوت همچنین سبب کاهش اندازه ذرات[1] می‌شود که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال در بافت افزایش می‌یابد (۱۵). اثرات مکانیکی فراصوت، باعث نفوذ بیشتری از حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم[2] را بهبود می‌بخشد. تخریب سلولی کارآمد و انتقال جرم مؤثر، دو فاکتور اصلی هستند که باعث افزایش استخراج با فراصوت می شود (۱۱). فراصوت احتمالاً آسان‌ترین روش برای تخریب سلول‌ها و تولید عصاره می‌باشد که بسیار کارآمد، ایمن و قابل اعتماد است. به دلایل مذکور، این روش، سریع‌تر و کامل‌تر از روش‌های معمول نظیر خیساندن و سایر روش‌های خیساندن است. نتایج مطالعه Xiao و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تأثیر زمان‌های مختلف اشعه‌دهی امواج مایکروویو (۵ الی ۳۰ دقیقه) بر میزان استخراج فلاونوئیدها از گیاه آستراگالوس[3] نشان داد که بازده فلاونوئیدها در ابتدا با افزایش زمان اشعه‌دهی افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود (۱/۰۳۳ میلی‌گرم به گرم) در ۲۵ دقیقه رسید و بعد از آن، به تدریج کاهش یافت (۳۰).Pan و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی استخراج تانشینون‌ها از *Salvia miltiorrhiza* با روش‌های سوکسله، مایکروویو و فراصوت بیان کردند که تکنیک مایکروویو طی زمان ۶۰ ثانیه بالاترین میزان استخراج را بین سه روش مورد ارزیابی به دست داد (۲۴). مزدستان و همکاران (۱۳۹۴) در ارزیابی تأثیر روش استخراج (سوکسله، خیساندن و فراصوت) با حلال متانول بر محتوی ترکیبات فنولی کل، ترکیبات فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ «گیاه مورد» مطابقت دارد که اعلام کردند بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد به عصاره حاصل از روش خیساندن مربوط می‌شود (۱). امروزه تقاضای رو به رشدی برای توسعه روش‌های کارآمدتر و مؤثرتر برای استخراج ترکیبات فعال موجود در مواد گیاهی وجود دارد. همچنین نحوه عمل استخراج می‌تواند به صورت سنتی از طریق روش‌هایی نظیر سوکسله، خیساندن و یا از طریق فناوری‌های جدیدی مانند مایکروویو و یا امواج فراصوت صورت گیرد. با توجه به اهمیّت ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی موجود در منابع طبیعی نظیر ریزجلبک‌ها، تعیین مقادیر ترکیبات مذکور و نیز انتخاب روش استخراج بهینه آن ها می‌تواند نقش مؤثری را در افزایش کارایی استخراج و دستیابی به سطوح بیشتر و یا غلیظ‌تر ترکیبات زیست‌فعال ایفا نماید. این مطالعه به منظور یافتن حلال و روش مناسب استخراج عصاره از ریز جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* با تکنیک‌های خیساندن، مایکروویو و فراصوت با دو حلال آب و اتانول جهت کاربرد بهتر آنها در مواد غذایی انجام پذیرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد اولیه مصرفی یا خوراکی مورد استفاده در پژوهش حاضر شامل ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* (پودر سبز رنگ، سینا ریزجلبک، قشم، ایران)، سیترات سدیم (۱درصد وزنی/ حجمی)، اتانولو متانول (۹۷ درصد)، مُعرف فولین ـ سیوکالتو[4]، آلومینیوم کلراید (محلول ۱۰ درصد)، کربنات سدیم (محلول ۲

1 - Particle size
2 - Mass transfer
3 - *Radix astragali*
4 - Folin-Ciocalteu

درصد) و محلول۲،۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DDPH)[1] همگی از شرکت مرک، آلمان بود. کاغذ صافی (واتمن)(شرکتCHN، اسپانیا)، آب مقطر (تجهیزآزما، ایران) و پارافیلم (آریان تجهیز، ایران) بود.

۲-۲- استخراج عصاره به روش خیساندن

در این روش، از حلال‌های آب مقطر و اتانول ۹۷ درصد استفاده شد. ۱۰۰ گرم از پودر *اسپیرولینا پلاتنسیس* به دقت توسط ترازوی دیجیتال وزن شد. سپس جهت تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی هرکدام را به طور جداگانه به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول اضافه گردید. سر ارلن‌ها با پارافیلم بسته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه همزن مغناطیسی (آلفا لاوال، سوئیس) قرار گرفت تا استخراج عصاره به طور کامل و مطلوب انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و ریزجلبک توسط کاغذ صافی (واتمن) از هم جدا شد و تفاله‌ها را فشرده تا کاملاً تخلیه شود و در نهایت عصاره‌های اولیه به دست آمد. عصاره‌های اولیه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، محلول رویی جمع‌آوری و به منظور تبخیر حلال‌ها، عصاره‌های حاصل وارد دستگاه تقطیر در خلاء (شرکت بوچی، سوئیس) شده و در دمای۸۰ درجه سانتی‌گراد حلال آن ها به مدت یک ساعت تبخیر و عصاره‌های تغلیظ شده به‌دست آمد. پس از این که عصاره‌ها کاملاً خشک شدند، عصاره‌ها توسط کاردک آزمایشگاهی کاملاً تراشیده شد. جهت حذف هرگونه آلودگی میکروبی، عصاره‌های خشک شده توسط اشعه ماوراء بنفش استریل و جهت اطمینان از استریل بودن، عصاره‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار (مرک آلمان) بررسی شد. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمایشات در ظرف تیره استریل ریخته ودر دمای۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

۲-۳- استخراج عصاره به روش فراصوت

در این روش، میزان مشخصی از پودر ریزجلبک همراه با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول به درون بطری شیشه‌ای انتقال یافت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در حمام فراصوت (مدل۶۰-FS، Fisher scientific، با فرکانس۴۰ کیلوهرتز، آلمان) قرار گرفت. محتوی درون بطری صاف و عصاره استخراجی تغلیظ گردید (۸).

۲-٤- استخراج عصاره به روش مایکروویو

۵ گرم نمونه با حلال مخلوط شده و مخلوط حاصل با امواج مایکروویو(مدل MicroSYNTH، شرکت Milestone، دانمارک) در زمان مشخص (۶ دقیقه) و توان ۱۵۰ وات اشعه‌دهی شد. برای کنترل دما، زمان به صورت متناوب اعمال گردید، به این ترتیب که بعد از هر دقیقه تابش امواج مایکروویو نمونه تا رسیدن به دمای کم‌تر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار داده شد. برای استخراج بهتر توسط امواج مایکروویو نمونه به مدت ۹۰دقیقه در حلال مربوطه بدون هم زدن خیسانده شده و در نهایت، عصاره به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی از مواد گیاهی جدا گردید (۲۴).

۲-۵- اندازه‌گیری میزان فلاونوئید

میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگی آلومینیوم کلرید انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم و ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر مخلوط شده و پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر با اسپکتروفتومتردو پرتویی ماوراءبنفش ـ مرئی (Cecil، مدل۲۵۰۲، کمبریج، انگلستان) قرائت گردید. کوئرستین (شرکت فولکا، آمریکا) به عنوان استاندارد استفاده شده و نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر میلی‌لیتر وزن عصاره گیاه بیان گردید. معادله منحنی و ضریب تعیین آن به ترتیب به صورت $y=0/00028x-0/0108$ و $R^2=0/9607$ بود. (۷).

۲-٦- اندازه‌گیری میزان کل فنول

مقدار فنول کل بر طبق روش Sun و همکاران و روش اصلاح شده Sun و همکاران (۲۰۰۷)(۲۸) با تغییرات اندک بر طبق روش Lu و همکاران انجام شد. به طور خلاصه، ۰/۱ میلی لیتر عصاره اتانولی با ۰/۷۵ میلی‌لیتر مُعرف فولین ۱۰ درصد مخلوط و پس از گذشت زمان ۱۰ دقیقه، ۰/۷۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲ درصد افزوده شده و پس از نگهداری در تاریکی به مدت ۴۵ دقیقه جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار فنول کل از منحنی کالیبراسیون (شکل۲) تهیه شده از

1-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

استانداردهای گالیک اسید تعیین گردید. نتایج برحسب میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن اسپیرولینا بیان شد (۱۸). معادله منحنی و ضریب تعیین آن به ترتیب به صورت $y=0/002x - 0/004$ و $R^2=0/9877$ بود.

۲-۷- اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد

به منظور تعیین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد، ابتدا عصاره متانولی تهیه شد. ۵گرم پودر اسپیرولینا درون فالکون ریخته شده و ۲۵ سی‌سی متانول به آن اضافه و با ورتکس به مدت ۲ دقیقه هم زده شد. در سانتریفوژ به مدت ۵دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. سپس لایه رویی به آرامی و به دقت برداشته شد. رسوب موجود در فالکون با قاشقک به هم زده شده و با ۲۵سی‌سی متانول تازه به مدت ۲ دقیقه در ورتکس هم زده شد. سپس با همان شرایط ذکر شده سانتریفوژ گردید. لایه رویی جدید به دست آمده به عصاره استخراج شده مرحله قبلی اضافه گردید (۶). این عصاره‌ها با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) فیلتر شده، محلول فیلتر شده، با شرایط مذکور مجدداً سانتریفوژ گردید. سپس محلول به دست آمده با متانول به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. عصاره متانولی عصاره حاصل تا زمان آنالیز در فریزر با دمای (۱۸-) درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بررسی فعالیت رادیکال‌گیرندگی عصاره با روش مهار رادیکال DPPH انجام شد (۵).

۲-۸- آنالیز آماری

جهت آنالیز داده‌ها از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی و برای بیان تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p<0/05$) استفاده شد. برای هر تیمار۳ تکرار در نظر گرفته شد. آنالیز آماری داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شده و تمامی نمودارها با نرم‌افزار Excel 2013 رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

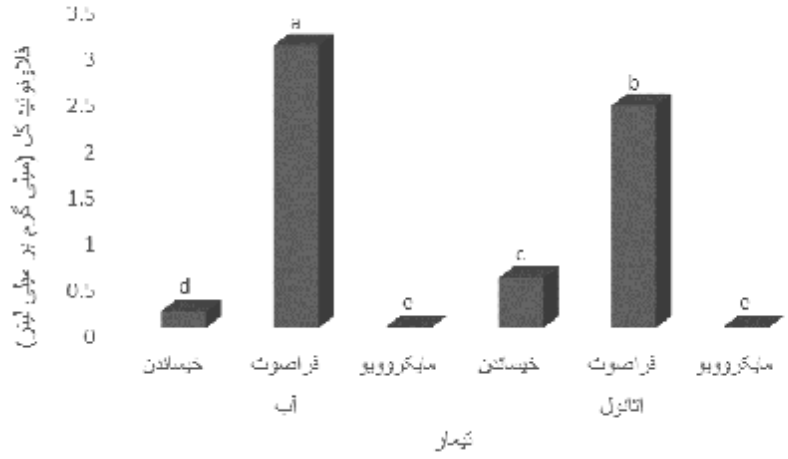
۳-۱- نتایج آنالیز میزان فلاونوئید

مطابق جدول۱، اثر نوع حلال، روش عصاره‌گیری و نوع حلال در روش عصاره‌گیری بر مقدار فلاوونوئید عصاره حاصل از ریزجلبک *اسپیرولینا* پلاتنسیس در سطح ۱ درصد کاملاً معنی‌دار ($p<0/05$) بود. بین دو حلال اتانول و آب مورد استفاده از نظر آماری تفاوت کاملاً معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$) و با حلال آب، مقادیر فلاوونوئید بیشتری (۱/۰۷±۰/۰۶mg/ml) استخراج گردید (شکل۱). به نظر می‌رسد که بازده عصاره‌گیری با افزایش قطبیت حلال افزایش یافته است. در بین حلال‌های مورد استفاده، آب بالاترین شاخص قطبیت را دارد که این امر ممکن است در بالا بودن راندمان عصاره‌گیری با آب مؤثر باشد (۲۲). از نظر روش استخراج نیز بین تمام روش‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$). بدین ترتیب که روش فراصوت بالاترین (۲/۷۱±۰/۱۴mg/ml) و روش مایکروویو، پائین‌ترین (۰/۰۱±۰/۰۰mg/ml) میزان فلاونوئید را داشت. تیمار فراصوت میزان محصول ورودی به حلال را تسهیل می‌کند که به دلیل افزایش در میزان انتشار حلال به درون بافت گیاهی و همچنین ایجاد خلل و فرج برای خروج آسان‌تر مولکول‌ها است. این نتیجه با نتایج برخی از تحقیقات هم‌خوانی دارد. به عنوان مثال، در استخراج عصاره قندی از تفاله نیشکر، روش فراصوت به وسیله شکستن دیواره سلولی و گسستن اتصال بین لیگنین و پلی‌ساکاریدهای مورد نظر، قابلیت استخراج آنها را افزایش می‌دهد (۱۷).

جدول۱- تجزیه واریانس اثر نوع حلال و روش عصاره‌گیری بر مقدار فلاوونوئید اسپیرولینا پلاتنسیس.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	F	P
نوع حلال	۱	۰/۰۴۳**	۱۶/۶۲	۰/۰۰۱۵
روش عصاره‌گیری	۲	۱۲/۹۸**	۵۰۱۴/۴۶	۰/۰۰۰۰۲۹
نوع حلال × روش عصاره‌گیری	۲	۰/۳۹**	۱۵۰/۹۲	۰/۰۰۰۳
خطا	۱۲	۰/۰۰۲۶		
کل	۱۷			
CV(%):۴/۹۵				

* معنی‌داری در سطح 5 درصد ($p< 0/05$) است.



شکل ۱ ـ مقایسه میانگین اثر نوع حلال و روش استخراج بر مقدار فلاوونوئید عصاره *اسپیرولینا* پلاتنسیس.

* حروف مشابه، نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) است.

روش فراصوت به همراه آب، بیشترین کارایی را در استخراج فلاونوئیدها از عصاره اسپیرولینا در مقایسه با روش خیساندن و مایکروویو و حلال اتانول نشان داد. کمترین میزان فلاونوئید به روش مایکروویو با هر دو نوع حلال آب و اتانول مربوط می‌شد که تفاوت معنی‌داری بین آن ها مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$). در روش خیساندن، حلال اتانول کارایی بیشتری در استخراج فلاونوئیدها در مقایسه با آب داشت. بین سایر تیمارها با یکدیگر نیز، تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). Albu و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که روش فراصوت سبب افزایش میزان کارنوسیک اسید استخراج شده از گیاه رزماری با همه حلال‌های مورد استفاده می‌شود و مدت زمان عصاره‌گیری را به شدت کاهش می‌دهد (۴). همچنین، Rostagno و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی استخراج ایزوفلاون‌های دانه سویا با روش‌های فراصوت و خیساندن، گزارش نمودند که راندمان استخراج در روش فراصوت بالاتر از روش غرقابی است، اگرچه این راندمان به غلظت حلال اولیه نیز بستگی دارد (۲۷).

۳-۲- نتایج آنالیز میزان فنول کل

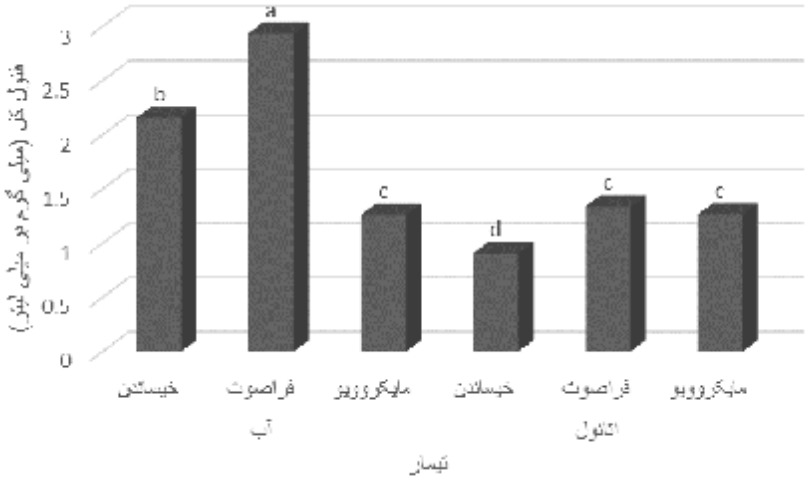
بر اساس تحقیقات انجام گرفته، بین مقادیر ترکیبات پلی‌فنول موجود در عصاره گیاه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، رابطه‌ای معنی دار وجود دارد، اگرچه بسته به شرایط استخراج نظیر دما و زمان و روش مورد استفاده استخراج، شدت این فعالیت متفاوت است. در این باره، Peterson و همکاران (۲۰۰۱) عصاره متانولی چند گیاه بومی را از نظر میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بررسی کرده و گزارش دادند که ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات پلی‌فنولی گیاه وجود دارد (۲۵). مطابق اطلاعات موجود در شکل۳، اثر نوع حلال و روش عصاره‌گیری و نوع حلال در روش عصاره‌گیری بر مقدار فنول کل *اسپیرولینا* پلاتنسیس در سطح ۵ درصد کاملاً معنی‌دار بود ($p<0/05$). در حالت کلی، حلال آب توانایی بیشتری در استخراج فنول کل از عصاره *اسپیرولینا* پلاتنسیس در مقایسه با اتانول داشت.

جدول۲- تجزیه واریانس اثر نوع حلال و روش عصاره‌گیری بر مقدار فنول کل اسپیرولینا پلاتنسیس.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	F	P
نوع حلال	۱	٤/۰٤**	۱۰۳۰/٦	۰/۰۰۰۰۰۵
روش عصاره‌گیری	۲	۱/۲۱**	۳۰۸/۳۷	۰/۰۰۰٤۸
نوع حلال × روش عصاره‌گیری	۲	۱/۰٦۳**	۲۷۰/۹٦	۰/۰۰۰۰۱
خطا	۱۲	۰/۰۰۳۹		
کل	۱۷			
CV(%):۳/۸۱				

*معنی‌داری در سطح 5 درصد (P< 0/05) می‌باشد.

در تأیید نتایج این پژوهش، Mohagheghi samarin و همکاران (۲۰۱۱) پس از استخراج ترکیبات فنولیک پوست سیب زمینی راموس با حلال‌های آب، متانول، اتانول، استن و هگزان دریافتند که استخراج با حلال آب به علت قطبیت بیشتر، دارای بیشترین راندمان است (۲۲). در مقابل، نتایج تحقیقات Jacques و همکاران (۲۰۰۵) با نتایج این پژوهش در تضاد است. آنها راندمان عصاره‌گیری از برگ بلوط را توسط حلال‌های متانول و هگزان با دو روش فراصوت و خیساندن مقایسه کرده و دریافتند که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در راندمان استخراج توسط حلال متانول وجود ندارد (۱۵). از بین روش‌های خیساندن، مایکروویو و فراصوت نیز، تکنیک اخیر کارایی بالاتری را نشان داد و مقادیر فنول کل استخراجی با این روش بیش از سایر روش‌های استخراج مورد بررسی در این پژوهش بود. بعلاوه، روش خیساندن راندمان استخراج بالاتری در مقایسه با روش مایکروویو داشت و تفاوت هر سه روش عصاره‌گیری از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود (p<۰/۰5).



شکل۲ ـ مقایسه میانگین اثر نوع حلال و روش استخراج بر مقدار فنول کل عصاره *اسپیرولینا* پلاتنسیس.

* حروف مشابه، نشاندهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد (p<۰/۰5) است.

Ying و Han (۲۰۱۱) از سه روش خیساندن، مایکروویو و فراصوت برای استخراج پلی‌ساکاریدها از برگ شاتوت استفاده کرده و گزارش دادند که از بین این روش، فراصوت بیشترین میزان قند را از برگ شاتوت استخراج نمود (۳۲). در تضاد با نتایج پژوهش حاضر، نتایج مطالعه‌ای نشان داد که عصاره گل آذین گیاه زولنگ[1]دارای محتوی تام فنولی ۵۸/۸، ۶۰/۱ و ۱۰۵/۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب برای سه روش استخراجی فراصوت، خیساندن و سوکسله بود. نتایج حاکی از وجود مواد فنولی بیشتر در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به دو روش دیگر بود (۲۳). با به‌کارگیری حلال آب، کمترین کارایی به روش مایکروویو مربوط می‌شد. بین هر سه تکنیک مورد استفاده در استخراج با آب، تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<۰/۰5$). بین دو حلال اتانول و آب، میانگین مقادیر فنول کل در استفاده از آب به طور معنی-داری بیشتر از اتانول بود (شکل۴). در این راستا، در مطالعه Falleh و همکاران (۲۰۱۲) بر روی گیاه *Mesembryanthemum edule* ، نتایج نشان داد که عصاره متانولی حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات پلی‌فنولی نسبت به عصاره اتانولی بود (۱۱).

۳-۳- نتایج اندازه‌گیری فعالیت رادیکال‌گیرندگی به روش DPPH

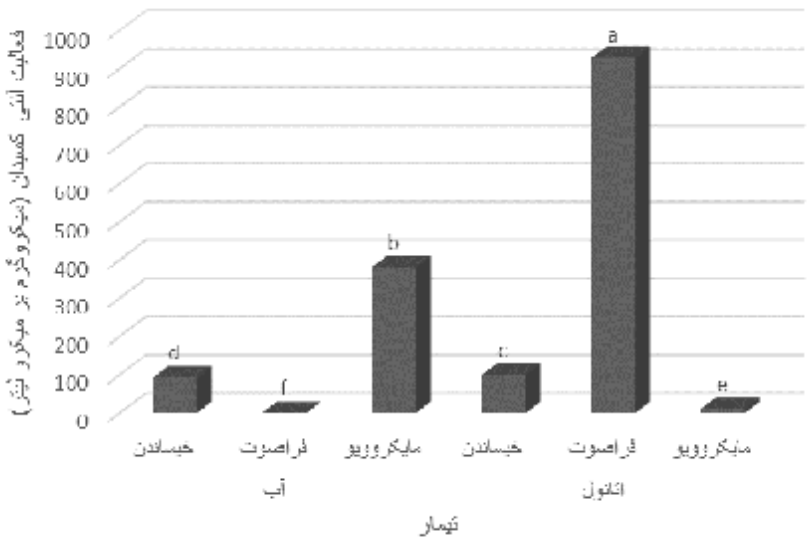
معمولاً برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری به نام IC_{50} استفاده می‌شود. طبق تعریف، IC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌شود که در آن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین، هرچه این شاخص کم تر باشد، نشاندهنده این است که عصاره مورد نظر، فعالیت ضدرادیکالی بیشتری دارد (۱۰، ۱۶). مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به طور گسترده برای ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاء شدن و تولید مولکول پایداری می کند که از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. این رادیکال در ۵۱۵ تا ۵۲۸ نانومتر جذب دارد (۱). بر اساس اطلاعات جدول ۳، اثرات متقابل نوع حلال، روش عصاره‌گیری و نوع حلال در روش عصاره‌گیری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی *اسپیرولینا پلاتنسیس* در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ($p>0/05$). اثر نوع حلال بر فعالیت مهار رادیکال آزاد عصاره *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تفاوت دو حلال اتانول و آب در سطح ۵درصد نیز معنی‌دار نبود ($p>۰/۰5$). بالاترین فعالیت به حلال آب مربوط می‌شد. بین روش‌های عصاره‌گیری، بیشترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی متعلق به روش خیساندن بود که کمترین میزان IC_{50} را نشان داد و تفاوت آن با دو تکنیک مایکروویو و فراصوت کاملاً معنی‌دار بود ($p<۰/۰5$)(شکل۳).

جدول۳- تجزیه واریانس اثر نوع حلال و روش عصاره‌گیری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا پلاتنسیس.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	F	P
نوع حلال	۱	۱۵۹۷۵۷/۵۵^{ns}	۱۵۶۸۴/۳۵	۰/۰۰۰۴۵
روش عصاره‌گیری	۲	۷۴۲۳۸۱/۱^{ns}	۷۲۸۸۳/۹۷	۰/۰۰۰۳
نوع حلال × روش عصاره-گیری	۲	۱۴۴۴۶۷/۷۶^{ns}	۱۴۱۸۳/۲۶	۰/۰۰۰۵۷
خطا	۱۲	۱۰/۱۹		
کل	۱۷			
CV(%):۱/۲۷				

Ns نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.

1 - *Eryngium caucasicum*



شکل۳ ـ مقایسه میانگین اثر نوع حلال و روش استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره *اسپیرولینا* پلاتنسیس.
* حروف مشابه، نشاندهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد ($p<0/05$) است.

ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیایی است که آن ها را قادر به خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه می‌سازد. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسایش چربی را مهارمی‌کنند(۲). همان گونه که از شکل ۶ دریافت می‌شود، بالاترین و پائین‌ترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های مورد ارزیابی به ترتیب به روش استخراج با فراصوت و حلال آب و روش فراصوت و اتانول مربوط می‌شد. بنابراین مشخص است که کارایی یک روش استخراج به طور معنی‌داری به حلال مورد استفاده وابسته است. استفاده از روش فراصوت برای عصاره گیری از این ریزجلبک با توجه به راندمان استحصال بیشتر در مدت زمان کمتر، روش مناسب‌تری است. Goli و همکاران(۲۰۰۵) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست پسته را بررسی کردند و نتایج مشابهی را در این زمینه گزارش نمودند (۱۳). این نتیجه با نتایج تحقیقات مزدستان و همکاران (۱۳۹۴) در ارزیابی تأثیر روش استخراج با سوکسله، خیساندن و فراصوت با متانول بر محتوی ترکیبات فنولی کل، ترکیبات فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ «گیاه مورد»[1] در تضاد است (۱).

٤- نتیجه‌گیری

در حال حاضر، یکی از مشکلات صنایع غذایی، استفاده از ترکیبات صنعتی مختلف به عنوان نگهدارنده در فرمولاسیون‌های مواد غذایی است که خطرات بالقوه آنها برای سلامتی مصرف‌کنندگان در تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است. در صنایع روغن به جهت ممانعت از وقوع اکسیداسیون روش‌های متعددی وجود دارد که یکی از آن ها، افزودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی است که اثرات جهش‌زایی و سرطان‌زایی در بدن انسان دارند. بنابراین، یافتن منابع مختلف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اعم از گیاهی، میکروبی و دریایی می‌تواند نقش مهمی را در بهبود کیفیت و افزایش ماندگاری مواد غذایی و در نتیجه، ارتقاء سلامت مصرف‌کننده ایفا نماید. با این هدف، در پژوهش حاضر، عصاره ریزجلبک *اسپیرولینا* پلاتنسیس به عنوان یکی از منابع ارزشمند آنتی‌اکسیدانی با تکنیک‌های مایکروویو، فراصوت و خیساندن و دو حلال پُرمصرف آب و اتانول استخراج شده و مقادیر فنول کل، فلاونوئید و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد عصاره‌های حاصل، مقایسه گردید.نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از تکنیک

1- *Myrtus communis*

فراصوت برای عصاره‌گیری از *اسپیرولینا* پلاتنسیس با توجه به راندمان استحصال بیشتر در مدت زمان کمتر، روش مناسب‌تری است. با این تکنیک، میزان فلاونوئید و فنول کل بیشتری نسبت به روش معمول خیساندن و تکنیک مایکروویو به دست آمد، ضمن اینکه عصاره‌های استخراجی، میزان فعالیت ضدرادیکالی بیشتری نیز داشتند. در رابطه با حلال‌ها، آب در مورد هر سه پارامتر مورد ارزیابی، بالاترین راندمان را نشان داد و در نهایت، تکنیک فراصوت ـ حلال آب به عنوان بهترین تیمار انتخاب گردید.

۵- منابع

۱. مزدستان، ش.، ابراهیم زاده، م.ع. و خلیلی،ک.۱۳۹٤. مقایسه اهمیّت روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی برگ گیاه مورد *Myrtus communis*. مجله دانشگاه علوم پزشکی *مازندران*، جلد ۲۵، شماره۱۲۷، ۲٤-۱۰.

2. Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima Moza*, in model and food systems. Food Chemistry, 105: 57-64.
3. Ahmadvand, H., Khosrobeigi, A. and Bagheri, S. 2008. Comparison of Inhibitory effects of *Satureja Khozistanica* oil extract, vitamin E and Coenzyme Q_{10} on LDL oxidation in vitro. *Yafteh*, 11(4): 25-31.
4. Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorime, J. P. and Manson, T.J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochem*, 11(3-4): 261- 265.
5. Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M. and Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem*, 52(26): 7970-7981.
6. Burits, M. and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*, (14):323-8.
7. Chang, C-C., Yang, MH., Wen, HM., Chern, JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 10(3):178-82.
8. Charpe, T.W. and Rathod, V.K. 2012. Extraction of glycyrrhizic acid fromlicorice root using ultrasound: Process intensification studies. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 54(0): 37-41.
9. Dawidowicz, A.L., Wianowska, D. and Baraniak, B. 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Ssambucus nigra L.* (antioxidant properties of extracts). *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologic*, 39: 308–315.
10. Dietz, B.M., Bolton, J.L. 2010. Biological reactive intermediates (BRIs) formed from botanical dietary supplements. *Chemico Biol Interact*,192(1-2): 72-80.
11. Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdelly, Ch. and Magne, Ch. 2012. Ultrasound-assisted extraction: effect of exraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule L.* Aizoaceae shoots. *Tro J of Pharm Res*, 11(2): 243-249.
12. Falquet, J. 2005. The nutritional aspects of Spirulina. Antenna Technol,1-5.
13. Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food chem*, 92(3): 521-525.
14. Gupta, M., Dwivedi, U.N. and Khandelwal, S. 2011. C-Phycocyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. *Toxicology Letters*, 204: 2–11.
15. Jacques, R.A., Freitas, L. S., Perez, V. F., Dariva, C., Oliveira, A.P. and Oliveira, J.V. 2005. The use of ultrasound in the exrraction of Ilex paraguariensi leaves: A comparison with maceration. *Ulrtasonics Sonochem*,14(1): 6-12.
16. Jimoh, F.O., Adedapo, A.A. and Afolayan, A.J. 2010. A Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and Leonotis leonorus. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 964-71.
17. Jing, S., RunCang, S., Xiao, S. and YinQuan, S. 2004. Fractional and physicochemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research*, 339: 291– 300.

18. Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H.M., Ross, C.F., Powers, J.R. and Tang, J. 2011. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (Allium cepa) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chem*,129(2):637-44.
19. Mahdavi Omran, S., Esmaeilzadeh, S. and Rahmani, Z.2010. Laboratory study of anticandidal activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils by micro dilution method. *Jundishapur J Microbiol*, 3(4):161-167.
20. Markesbery, W.R. and Lovell, M.A.1998. Four-hydrononenal, a product of lipid peroxidation is increased in the brain in Alzheimer,s disease. *Neurobiology Aging of Disease*,19: 33-36.
21. Mathew, S. and Abraham, T.E. 2006. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *The journal Food and Chemical Toxicology*, 44: 198-206.
22. Mohagheghi samarin, A., Poorazarang, H., Elhami rad, A. H., Dezashibi, Z. and Helatyar, N. 2011. Extraction of phenolic compounds in potato skins Ramos with two ultrasound methods and Percolation and evaluation of antioxidant activity in extracts of soybean oil. *Journal of Food Science and Technology*, 8 (1): 81-91.
23. Motallebi Riekandeh, S., Mazandarani, M., Ebrahimzadeh, M. A. and Zargari, M. 2016. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from *Eryngium caucasicum* (Apiaceae) inflorescence. Eur Rev Med Pharmacol Sci. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20: 946-49.
24. Pan, X.., Niu, G. and Liu, H. 2002. Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge*. *Biochemical Engineering Journal*, 12: 71-77.
25. Peterson, D.M., Emmons, C.L. and Hibbs, A. 2001. Phenolic antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *The Journal of Cereal Science*, 33: 97-103.
26. Richmond, A. 2004. Biological principles of mass cultivation. In: Richmond, A. (Ed) Handbook of Microalgal Culture, pp.125–177, Blackwell Publishing, Ames, USA.
27. Rostagno, A., Palma, M. and Barroso, C. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography*, 1012: 119-128.
28. Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q. and Zeng, X. 2011. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 78: 311-320.
29. Tabatabaei raisi, A., Khaligi, A. and Kashi, A. 2007. Antioxidant activity and chemical compositions of essential oil of aerial parts of *Satureja sahendica Bornm*. *Pharmaceutical Sciences*, 3: 1-6.
30. Xiao, W., Han, N. and Shi, B.2008. Microwaveassisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. *Separation and Purification Technology*, 62(3): 614-618.
31. X Hou, D. 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current Molecular Medicine*, 3: 149-159.
32. Ying, Z., Han, X. and Li, J. 2011. Ultrasound - assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*,127: 1273-79.
33. Zhang, J., Yuan, K. and Zhou, W.L. 2011. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica Linn*. From southern China. *Pharmacogn Mag*, 7(25): 35-39.

(Original Research Paper)

Determination of Phenolic Compounds and Free Radical Scavenging Activity of Microalgae *Spirulina platensis* by Various Extraction Methods

Parisa Delfan[1], Seyyed Ali Mortazavi[1*], Amir Hassein Elhami Rad[1], Masoud Shaffafi Zenoozian[1]

1-Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

Received: 29/08/2018 Accepted:09/12/2019

Abstract

In this study, extracts of microalgae *Spirulina platensis* were extracted by maceration, microwave and ultrasound methods and water and ethanol as solvent under controlled conditions. Determination of total flavonoid content (TFC) and total phenolic content (TPC) as well as free radical scavenging activity (IC_{50}) of the extracts done based on Alcl method, follin-ciocaltuea and absorption of radical DPPH (2,2-diphenyl -1-ipicryl hydrasil) respectively and in triplicate. The results showed that between extraction techniques, ultrasound and between two solvents used, water had the best efficiency of extraction the TPC, TFC and free radical scavenging activity. By ultrasound technique, PC, TFC and IC_{50} were ۲.۱۳±۰/۳۶ (mg/g), ۳.۴±۰/۳۵ (mg/g) and ۰.۳۴ ±۰/۳۵ (µg/ml) respectively. As a conclusion, it can be concluded that the application of ultrasound technique and water in comparsion with other five treatments showed the best efficiency and finally, it was selected as an optimal treatment.

Keywords: Antioxidant, *Spirulina platensis*, Extraction, Bioactive Copmounds.

*Corresponding Author: morteza@um.ac.ir