مقاله علمی - پژوهشی:

مقایسه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی عصاره‌های اتانولی، آبی و آبی- اتانولی چهار گونه نرم‌تن دریایی ساحل قشم

پریا اکبری*[1]، سیمین دلیران[1]، اسماء مفتاح‌زهی[1]

* paria.akbary@gmail.com

۱-گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: آبان ۱٤۰۰

چکیده

این مطالعه به مقایسه فعالیت آنتی اکسیدان و محتوای فنلی عصاره چهار گونه نرم‌تن (دوکفه‌ای صخره‌ای اویستر؛ *Saccostrea cuculate*، دوکفه‌ای کلم؛ *Callista umbonella* و صدف ملوک یا استوانه‌ای؛ *Solen vagina* و حلزون خوراکی؛ *Ampullaria cuprina*) و تعیین بهترین نرم‌تن درساحل قشم پرداخته است. گونه‌های نرم‌تن (هرکدام ۱۰۰ عدد) پس از جمع‌آوری، در جعبه‌های سرد به همراه یخ نگهداری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌ها به‌خوبی آسیاب و عصاره‌های آبی، اتانولی (اتانول ۹۰ درصد) و اتانولی: آبی (۵۰:۵۰) از آنها تهیه شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار محتوای فنلی (۸۱/۶۶ میلی‌گرم بر گرم عصاره)، فعالیت ضد رادیکالی دی فنیل پیکریل هیدرازیل (۱۷۲۲/۶۶ میکرومول ترولکس بر گرم عصاره) و فعالیت ضد رادیکالی معادل ترولکس آن (۶۴۹/۳۳ میکرومول ترولکس بر گرم عصاره) در عصاره اتانولی حلزون خوراکی مشاهده شد. همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به سه روش فسفومولیبدیم ۶۰۶/۶۶ میکرومول ترولکس و احیاء آهن (۷۴۰ میکرومول آهن در گرم عصاره و توان احیاء کنندگی ۱/۲۴ در حلزون خوراکی دارای ماکزیمم فعالیت بود. عصاره‌های آبی، اتانولی و اتانولی: آبی ۴ گونه نرم‌تن در تمامی مدل‌های مورد مطالعه سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دادند. در کل، عصاره اتانولی حلزون خوراکی بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی را نشان داد که می‌تواند به عنوان منابع غنی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی برای استفاده از مواد غذایی توصیه شود.

لغات کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل، دو کفه‌ای اویستر، دو کفه‌ای کلم، ملوک، حلزون خوراکی

*نویسنده مسئول

مقدمه

نرم‌تنان خلیج فارس و دریای عمان دارای ترکیبات زیست‌فعال متعددی بوده ولی پژوهش‌های بسیار اندکی بر گونه‌های شناسایی شده، انجام شده است و انجام مطالعات گسترده‌تر بر گونه‌های بیشتر نرم‌تنان همواره توصیه شده است. برای مثال، Qiao و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی پلی ساکاریدهای صدف *Hyriopsis cumingii* را در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد بررسی قرار دادند. در آزمایش آنتی اکسیدان، عصاره خام و فرکشن‌های خالص آن می‌تواند پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های آزاد آنیون سوپر اکسید و ۲،۲-دی فینیل-۱-پیکریل هیدرازیل[1] را کاهش دهد. Kanchana و همکاران (۲۰۱۳) اسید هیالورونیک را از دو کفه‌ای دریایی *Amussium pleuronectus* جدا سازی کردند و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن را مورد بررسی قرار دادند. یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر از این ترکیب توانایی حذف رادیکال‌های آزادآزینو- بیس-۳ اتیل بنزوتیوزولین- ۶ سولفونیک اسید[2]، ۲،۲-دی فینیل-۱-پیکریل هیدرازیلو هیدروکسیل به‌ترتیب ۳۵/۷۱، ۴۲/۵۴ و ۴۲/۶۳درصد را نشان داد. در نتیجه، اسید هیالورونیک جدا شده از این دو کفه‌ای دریایی را می‌توان به عنوان عامل آنتی‌اکسیدان قوی استفاده کرد. Nazeer و Naqash (۲۰۱۳) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره دو گونه نرم‌تن *Loligoduvauceli* و*Donax cuneatus* در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که عصاره استات اتیل صدف *L. duvauceli* فعالیت دی فنیل پیکریل هیدرازیل (۵۸ درصد) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۴ درصد) بیشتری را در مقایسه با سایر عصاره‌ها نشان داد.

در ساحل قشم به علت مقادیر زیادی از تولیدات اولیه و منابع غذایی متنوع، تنوع وسیعی از شاخه نرم‌تنان مشاهده می‌شود و هنگام جزر ، اغلب زنان و کودکان از ناحیه بین جزر ومدی آنها را جمع آوری می‌کنند. نرم‌تنان دومین شاخه بزرگ با شش رده هستند که حدود ۲۳ درصد از کل موجودات زنده دریایی را دربرمی‌گیرند و در بسیاری از کشورهای دنیا و به‌ویژه در کشورهای آسیای شرقی، مردمان ساحل نشین بسیاری از بی‌مهرگان دریایی را به صورت مستقیم صید می‌کنند و مورد مصرف قرار می‌دهند (Amsler *et al.*, 2001). اخیراً از طریق یافته‌های علمی نیز اطمینان حاصل شده است که برخی از گونه‌های بی‌مهرگان دریایی از قابلیت مصرف خوراکی یا دارویی قوی برخوردارند (Nazeer and Naqash, 2013). همچنین نرم‌تنان دارای مکانیسم سازگاری خوبی هستند. بنابراین، در همه زیستگاه‌ها از منطقه بین جزرومدی تا قسمت‌های عمیق اقیانوس‌ها یافت می‌شوند.

به رغم وجود این اطلاعات تاریخی در دنیا و حضور بسیاری از گونه‌های بی‌مهرگان آبزی به‌ویژه نرم‌تنان در سواحل جنوبی کشورمان، تاکنون اطلاعات محدودی از نوع ترکیبات و ویژگی‌های زیستی این گونه‌ها در دسترس می‌باشد. در مجموع، نتایج تحقیقات متعدد نشان داده است که نرم‌تنان دریایی فعالیت‌های زیستی متعددی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند که میزان این فعالیت‌ها در گونه‌ها و مناطق مختلف جغرافیایی تفاوت‌های زیادی با یکدیگر دارد. از آن‌جایی‌که در حال حاضر، بشر به دنبال کشف ترکیبات فراسودمند طبیعی برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های شایع به‌ویژه سرطان می‌باشد، این تحقیق به مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی عصاره آبی، اتانولی و اتانولی-آبی چهار گونه از نرم‌تنان دریایی شامل دوکفه‌ای صخره‌ای اویستر (*Saccostrea cuculate*)، دوکفه‌ای کلم (*Callistaumbonella*) و صدف ملوک یا استوانه‌ای (*Solen vagina*) و یک گونه حلزون خوراکی (*Ampullaria cuprina*) و تعیین بهترین نوع نرم‌تن در ساحل قشم می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

تهیه نرم‌تن‌ها و عصاره‌گیری

سه گونه صدف خوراکی با نام‌های دوکفه‌ای صخره‌ای اویستر (*Saccostrea cuculate*)، دوکفه‌ای کلم

[1]2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH),
[2]Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-. 6-sulfonic acid (ABTS)

(*Callistaumbonella*) و صدف ملوک یا استوانه‌ای (*Solen vagina*) و یک گونه حلزون خوراکی (*Ampullaria cuprina*) زمستان ۱۳۹۷ از شرکت ماهی بندر واقع در پارک علم و فناوری هرمزگان خریداری شده و هر کدام از نمونه‌های نرم‌تن در بسته‌های یک کیلوگرم که حاوی یخ بودند، به آزمایشگاه شرکت سنجش پاسارگاد تهران انتقال داده شدند. سپس قسمت گوشتی از محوطه پوسته آنها جدا شد و فقط قسمت گوشتی نرم‌تن در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت خشک شد. سپس آسیاب و به صورت پودر درآمدند. جهت تهیه عصاره آبی، اتانول ۹۰ درصد و اتانولی: آبی (۵۰:۵۰) از هر یک از ۴ گونه نرم‌تن، ۵ گرم از پودر حاصله از نرم‌تن، با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد و ۵۰ میلی‌لیتر اتانول: آبی (۵۰:۵۰) مخلوط و در دستگاه سوکسله (Qickfit, UK) قرار گرفت. این عمل چندین بار تکرار شد تا مقدار مناسب عصاره از هر نرم‌تن تهیه شد. نهایتاً با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان (IKA, Germany) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌ها تغلیظ شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند (Ridzwan *et al.*, 1995).

اندازه‌گیری فنل کل

مقادیر فنل کل سه نوع عصاره هر یک از نرم‌تن‌ها با اندکی تغییر با روش Singleton و Rossi (۱۹۶۵) اندازه‌گیری شد. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره با ۰/۸ میکرولیتر معرف فولین –سیکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱به ۱۰) مخلوط شد و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۰/۸ میکرو لیتراز بی کربنات سدیم ۶ درصد اضافه و مخلوط شد و بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نوری آن به‌وسیله اسپکتروفتومتر (Shimadzu, uv-1800, Japan) در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد. مقادیر فنل کل در هریک از عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌وسیله توان آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس(TEAC) [1]

فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های چهار نرم‌تن با روش Re و همکاران (۱۹۹۲) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. ۲/۴۵ میلی مولار پتاسیم با ۷ میلی مولار۲-۲ پریم ازینو بیس (۳ اتیل بنزوتیوزولین- ۶ سولفونیک اسیدنمک دی آمونیوم) (ABTS)[2] مخلوط شد و ایجاد کاتیون رادیکال ABTS کرد. سپس در دمای اتاق به مدت ۲۰ ساعت نگهداری شد. ۱ میلی‌لیتر از محلولABTS با ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵ میلی مولار (pH=۷/۴) رقیق شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ABTS رقیق شده به ۲۰ میکرولیتر عصاره نرم‌تن به همراه ۶۰ میکرولیتر از حلال خودشان اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۶۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. بوتیل هیدروکسی تولوئن (غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ترولکس (با غلظت ۵-۰/۲ میلی مولار) به‌ترتیب به عنوان کنترل مثبت و استاندارد استفاده شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرو مول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره بیان گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان به وسیله دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) [3]

فعالیت خنثی سازی رادیکال آزاد[4] دی فنیل پیکریل هیدرازیل سه نوع عصاره هر چهار نرم‌تن با روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) و مهدی آبکنار (۱۴۰۰) با استفاده از کیت اندازه‌گیری ظرفیت خنثی سازی رادیکال آزاد بر اساس روش DPPH (کیت زیتوکس تهیه شده از شرکت کاوش آزما) در طول موج ۵۱۵ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و مقدار DPPH بر

[1]-Trolex Equivalent Antioxidant Capacity
[2]Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-. 6-sulfonic acid (ABTS)
[3] Di Phenyl Picryl Hydrazyl
[4] Radical Scavenging activity

حسب میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره بیان گردید.

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن (FRAP)[1]

برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدان احیاء آهن سه نوع عصاره هر یک از چهار گونه نرم‌تن از روش Benzie و Strain (۱۹۹۹) استفاده شد. با استفاده از کیت اندازه‌گیری ظرفیت خنثی سازی رادیکال آزاد بر اساس روش DPPH (کیت زیتوکس تهیه شده از شرکت کاوش آزما) در طول موج ۵۹۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میکرومول آهن در میلی‌گرم وزن خشک عصاره محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طریف فسفومولیبدیم (PMB) [2]

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به طریق کمپلکس فسفومولیبدیم از روش Prieto و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. به ۰/۱ میلی‌لیتر از سه نوع عصاره هر یک از چهار گونه نرم‌تن مورد مطالعه (غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با محلول استاندارد ترولکس (غلظت ۰/۴-۱/۶ میکرومول)، ۱ میلی‌لیتر از محلول معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مول، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مول و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مول) اضافه و مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر در مقابل محلول شاهد قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان به روش توان احیاءکنندگی (RP)[3]

برای اندازه‌گیری پتانسیل احیاءکنندگی سه نوع عصاره چهار گونه نرم‌تن از روش Oyaizu (۱۹۸۶) با اندکی تغییر استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از هر عصاره نرم‌تن (در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱/۵ میلی‌لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) مخلوط شد. سپس محلول حاصل، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرارگرفت. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به آن اضافه شد و در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از فازمحلول سانتریفیوژ شده جدا شد و با ۰/۲ میلی‌لیتر از کلرید آهن ۱ درصد و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از ۱۰ دقیقه جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. بوتیل هیدروکسی آنیزول به عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاد از نرم افزارSPSS ویرایش ۱۹ و بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از تست کولموگروف-اسمیرنوف و برابری واریانس‌ها با تست لون بررسی شد. بعد از مشخص شدن معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها، برای رتبه‌بندی آنها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمال $p<۰/۰۵$ استفاده شد. برای تمامی اندازه‌گیری‌ها هر عصاره نرم‌تن‌ها سه بار تکرار صورت گرفت و مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید.

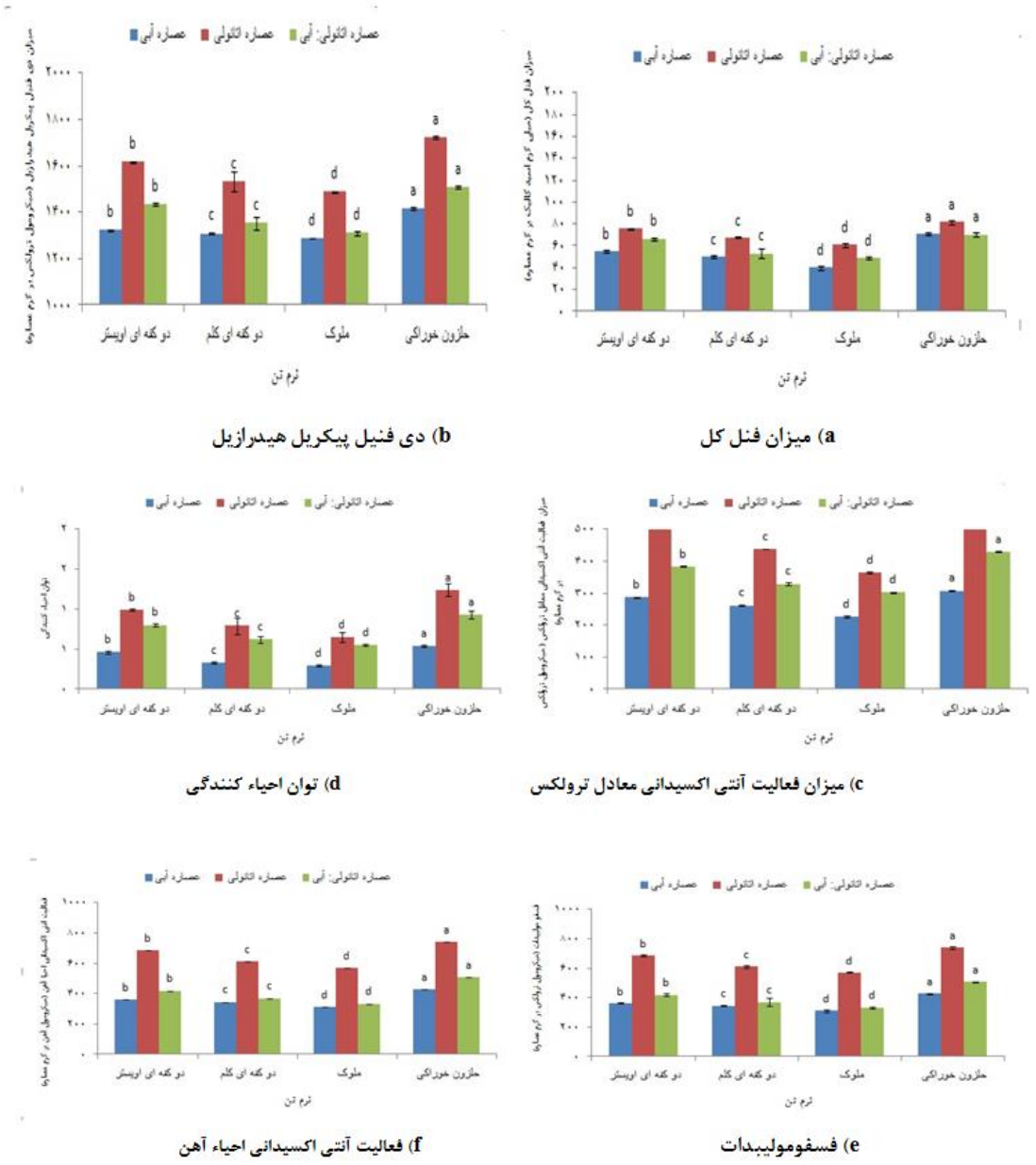
نتایج

محتوای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه نوع عصاره مختلف چهار گونه نرم‌تن مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه داده شده است. میزان فنل کل در عصاره اتانولی چهار

[1] Ferric Reducing Power (FRAP)
[2] Phosphomolybdate
[3] Reducing Power

گونه نرم‌تن در مقایسه با عصاره اتانولی: آبی بیشتر بود. دامنه فنل کل در عصاره اتانولی ۸۱/۶۶-۶۰/۶۶ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره، در عصاره اتانولی: آبی ۷۰/۳۳-۴۰ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره و عصاره آبی ۷۰/۵۵-۴۰ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره بود.

عصاره اتانولی حلزون خوراکی در مقایسه با عصاره اتانولی سه گونه صدف بیشترین میزان فنل کل را نشان داد و بعد از آن به‌ترتیب بیشترین میزان در دو کفه‌ای اویستر، کلم و ملوک مشاهده شد (شکل ۱a).



a) میزان فنل کل

b) دی فنیل پیکریل هیدرازیل

c) میزان فعالیت آنتی اکسیدانی معادل ترولکس

d) توان احیاء کنندگی

e) فسفومولیبدات

f) فعالیت آنتی اکسیدانی احیاء آهن

شکل ۱: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدان و فنل کل سه نوع عصاره مختلف از ۴ گونه نرم تن مورد مطالعه

Figure 1: Comparison of antioxidant activity and total phenol of three different types of extracts from 4 studied mollusk species

برای عصاره‌های آبی و عصاره اتانولی: آبی نیز بیشترین میزان فنل کل به‌ترتیب در حلزون خوراکی، دوکفه‌ای اویستر، کلم و ملوک مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل، فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن، فسفومولیبدات، توان احیاء کنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس در حلزون خوراکی و سپس به‌ترتیب در دو کفه‌ای صخره‌ای (اویستر)، دوکفه‌ای کلم و ملوک مشاهده شد (شکل ۱).

همچنین در چهار گونه نرم‌تن، عصاره اتانولی بیشترین دی فنیل پیکریل هیدرازیل، فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن، فسفومولیبدات، توان احیاءکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس را نشان دادکه با سایر عصاره‌ها این اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) و کمترین میزان این شاخص‌ها در عصاره آبی هر چهار گونه نرم‌تن مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنل کل سه نوع عصاره مختلف چهارگونه نرم تن مورد مطالعه

Table 1: Antioxidant activity and total phenolic content of 3 different extracts of 4 mollusk species under study

گونه	عصاره	فنل کل میلی گرم اسید گالیک بر گرم عصاره	دی فنیل پیکریل هیدرازیل میکرومول ترولکس بر گرم عصاره	فعالیت آنتی اکسیدانی احیاء آهن میکرومول آهن بر گرم عصاره	فسفومولیبدیم میکرومول ترولکس بر گرم عصاره	توان احیاء کنندگی	فعالیت انتی اکسیدانی معادل ترولکس میکرومولترولکس بر گرم عصاره
دو کفه‌ای صخره‌ای اویستر (*S. cuculate*)	آبی	۵۵/۲۲ ± ۱/۳۴^{c}	۱۳۲۳/۲۲ ± ۲/۶۱^{c}	۳۶۲/۶۶ ± ۲/۵۱^{c}	۳۷۵/۳۳ ± ۶/۴۳^{c}	۰/۴۶ ± ۰/۰۲^{c}	۲۸۶/۸۹ ± ۱/۸۱^{c}
	اتانولی	۷۵/۳۳ ± ۱/۰۴^{a}	۱۶۱۷/۶۶ ± ۲/۵۱^{a}	۶۸۶/۰۱ ± ۵/۲۹^{a}	۵۹۰ ± ۱۰/۰۰^{a}	۰/۹۹ ± ۰/۰۱^{a}	۵۳۲/۶۶ ± ۶/۴۲^{a}
	اتانول: آبی	۶۶/۵۶ ± ۱/۲۵^{b}	۱۴۳۶/۳۳ ± ۴/۷۲^{b}	۴۱۹/۳۳ ± ۹/۰۱^{b}	۴۲۰ ± ۱۰/۱۰^{b}	۰/۳۳ ± ۰/۰۲^{c}	۳۸۳/۶۶ ± ۵/۱۳^{b}
دوکفه‌ای کلم (*Callista umbonella*)	آبی	۵۰/۰۶ ± ۱/۱۶^{b}	۱۳۰۸/۶۶ ± ۴/۱۶^{b}	۳۴۵ ± ۴/۳۵^{b}	۳۵۰/۰۱ ±۲^{b}	۰/۷۹ ± ۰/۱۱^{a}	۲۶۱/۳۳ ± ۶/۱۱^{c}
	اتانولی	۶۷/۶۶ ± ۰/۵۷^{a}	۱۵۳۱/۳۳ ± ۴۲/۲۵^{a}	۶۱۰ ± ۱۰/۱۰^{a}	۵۵۰/۱۱± ۱۰/۱۰^{a}	۰/۶۲ ± ۰/۰۴^{b}	۴۳۸/۶۶ ± ۱۱/۰۲^{a}
	اتانولی: آبی	۵۳/۱۶ ± ۴/۳۵^{b}	۱۳۵۲/۶۶ ± ۲۸/۳۰^{b}	۳۶۹/۶۶ ± ۲۶/۲۷^{b}	۳۵۴/۳۳ ± ۲۹/۱۰^{b}	۱/۹۱ ± ۰/۱۰^{c}	۳۲۹ ± ۱۷/۳۴^{b}
صدف ملوک یا استوانه‌ای (*Solen vagina*)	آبی	۴۰ ± ۲/۰۲^{c}	۱۲۸۷/۳۳ ± ۲/۵۲^{c}	۳۱۰/۰۱ ± ۱۰^{c}	۲۸۸/۳۳ ± ۱/۵۲^{c}	۰/۲۹ ± ۰/۰۱^{c}	۲۲۶/۳۳ ± ۵/۶۸^{c}
	اتانولی	۶۰/۶۶ ± ۲/۰۸^{a}	۱۴۸۷/۳۳ ± ۲/۵۱^{a}	۵۷۰/۳۳ ± ۲/۵۱^{a}	۴۴۲/۳۳ ± ۵/۸۵^{a}	۰/۶۵ ± ۰/۰۶^{a}	۳۶۵ ± ۴/۳۵^{a}
	اتانولی: آبی	۴۹± ۱/۰۲^{b}	۱۳۱۰± ۱۰/۰۲^{b}	۳۳۲/۶۶ ± ۶/۴۲^{b}	۳۲۵/۶۶ ± ۵/۱۳^{b}	۰/۵۵ ± ۰/۰۱^{b}	۳۰۲/۶۶± ۵/۵۳^{b}
حلزون خوراکی (*Ampullaria cuprina*)	آبی	۷۰/۵۵ ± ۱/۲۶^{b}	۱۴۱۶± ۵/۲۹^{c}	۴۲۷/۶۶ ± ۲/۵۱^{c}	۴۰۴/۳۳ ± ۱/۵۲^{c}	۰/۵۴ ± ۰/۰۱^{c}	۳۰۷/۳۳ ± ۳/۰۵^{c}
	اتانولی	۸۱/۶۶ ± ۱/۵۲^{a}	۱۷۲۲/۶۶ ± ۶/۴۲^{a}	۷۴۰ ± ۱۰/۱۰^{a}	۶۰۶/۶۶ ± ۳/۵۱^{a}	۱/۲۴ ± ۰/۰۸^{a}	۶۴۹/۳۳ ± ۱۱/۱۰^{a}
	اتانولی: آبی	۷۰/۳۳ ± ۱/۵۲^{b}	۱۵۰۹ ± ۴/۵۸^{b}	۵۰۵۶۶/± ۳/۷۹^{b}	۵۱۶ ± ۵/۲۹^{b}	۰/۹۳ ± ۰/۰۵^{b}	۴۲۹/۳۳ ± ۱/۱۵^{b}

مقادیر (میانگین± خطای معیار، حاصل سه تکرار) با حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین نرم تنان مورد مطالعه است. (P<۰/۰۵).

بحث

بی‌مهرگان دریایی دارای فعالیت‌های دارویی و خواص زیست فعالی هستند که در عرصه زیست پزشکی مورد توجه قرار گرفتند. با توجه به اهمیت محصولات طبیعی دریایی و کاربرد گسترده آنها در صنعت داروسازی، توجه به این منابع جدید حائز اهمیت است. در این تحقیق، حلزون خوراکی و صدف استوانه‌ای (ملوک) به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی در هر یک از عصاره‌های آبی، اتانولی و

اتانولی: آبی بود. برای تأمین آنتی اکسیدان‌های طبیعی مورد نیاز بدن، مصرف غذاهای دریایی با ترکیبات فنلی بالا توصیه می‌شود (Nazeer and Naqash, 2013). در این تحقیق الگوی میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از بیشترین به کمترین شامل: حلزون خوراکی>دو کفه‌ای اویستر>صدف کلم>ملوک بود. Pachaiyappan و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که در مقایسه با شکم پایان، صدف‌های دو کفه‌ای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند که با تحقیق حاضر هم‌خوانی نداشت که این اختلاف می‌تواند ناشی از به‌کار بردن روش‌های مختلف اندازه‌گیری، استخراج، استانداردهای مختلف برای بیان نتایج و گونه دانست (Alexandru *et al.*, 2007). می‌توان گفت که خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی حلزون ممکن است مربوط به ترکیبات فنلی موجود در آن باشد. در مطالعه دیگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی شکم پایان با استفاده از دی فنیل پیکریل هیدرازیل نشان داده شد که با این مطالعه هم‌خوانی داشت (Pachaiyappan *et al.*, 2014). خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظت کبدی دوکفه‌ای‌ها به دلیل وجود ترکیبات فنل کل در ساختار آنهاست. بنابراین، استفاده از دو کفه‌ای به عنوان غذای دریایی در درمان ناراحتی‌های کبدی به علت نقش حفاظت کبدی و آنتی‌اکسیدانی است (Nazeer and Naqash, 2013). با افزایش ترکیبات فنل کل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود و ترکیبات فنلی با وزن مولکولی زیاد از توانایی زیادی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد برخوردارند و این توانایی به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جابه‌جا شونده هیدروکسیل بستگی دارد (Lagouri and Boskou, 1996). همچنین رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل یک رادیکال آزاد، پایدار، آلی و نیتروژن‌داری است که به طور وسیعی برای آزمایش پاک‌کردن رادیکال‌های آزاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Shimoji *et al.*, 2002). Pachaiyappan و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل دو کفه‌ای کلم (*Meretrixmeretrix*) بیشتر از صدف اویستر (*Crassostrea madrasensis*) بود که با نتایج این مغایرت داشت که می‌توان این اختلاف را به علت روش‌های مختلف عصاره‌گیری و گونه دانست. اتانول در بین حلال‌های رایج جهت عصاره‌گیری برای ترکیبات قطبی و غیر قطبی دارای بیشترین کارائی می‌باشد. بنابراین، هر نوع اندازه‌گیری با عصاره اتانولی می‌تواند باعث استخراج ترکیبات قطبی و غیر قطبی و در نتیجه خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتر شود (Harborne, 1998). آزمون پتانسیل آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس و دی فنیل پیکریل هیدرازیل هر دو رادیکال آزاد سنتزی می‌باشند که کاربرد آنها مشابه می‌باشد، هر چند پتانسیل آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس را می‌توان در اندازه‌گیری فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات قطبی و غیر قطبی استفاده کرد (Arnao, 2000). الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس و دی فنیل پیکریل هیدرازیل نرم‌تنان مورد مطالعه حلزون خوراکی>دو کفه‌ای اویستر>صدف کلم>ملوک بود. دلیل مشابه بودن الگوی فعالیت این دو آزمون به علت مکانیسم یکسان آنهاست. آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن روشی است که به طور مستقیم آنتی اکسیدان‌ها یا احیاءکننده‌ها را در عصاره‌ها اندازه‌گیری می‌کند و رابطه خطی با غلظت آنتی اکسیدان‌ها دارد (Prior *et al.*, 2005).

هنگامی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن بالایی در نرم‌تنان مشاهده می‌شود، بدین معناست که قادرند به‌راحتی رادیکال‌های آزاد موجود در بدن را خنثی کنند. الگوی فعالیت به‌ترتیب بیشترین خاصیت ضد رادیکالی شامل: حلزون خوراکی>دو کفه‌ای اویستر>صدف کلم>ملوک، بود.

مکانیسم روش فسفومولیبدینم بر اساس احیاء مولیبدنم (VI) به مولیبدنم (V) استوار است (Kanner *et al.*, 1994). بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب شامل: حلزون خوراکی>دو کفه‌ای اویستر>صدف کلم>ملوک، بود. در آزمایش توان احیاء کنندگی، احیاء آهن فریک به فروس به عنوان شاخص برای پتاسیل الکترون دهی به‌کار می‌رود و از جذب نوری برای شدت خاصیت احیاءکنندگی استفاده می‌شود که افزایش در جذب نوری مخلوط واکنش، بیان‌گر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، لذا

بدون واحد اندازه‌گیری است (Jayaprakash *et al.*, 2001). توان احیاءکنندگی هر سه عصاره به‌ترتیب بیشترین به کم‌ترین شامل: حلزون خوراکی>دو کفه‌ای اویستر>صدف کلم>ملوک، بود که الگوی ترکیبات فنلی به عنوان دهنده الکترون عمل می‌کنند و ممکن است واکنش‌های ناخواسته ایجاد شده به‌وسیله رادیکال‌های آزاد در بدن را خنثی کنند (Rajesh *et al.*, 2008) که با نتایج حاصل از تحقیق Nazeer و Naqash (۲۰۱۳) بر توان احیاءکنندگی عصاره اتیل استات دو گونه نرم‌تن *Loligoduvauceli* و *Donax cuneatus* هم‌خوانی داشت.

در کل می‌توان گفت با الگوی میزان فنل کل وفعالیت آنتی‌اکسیدانی در ۴ آزمون مورد مطالعه، به‌ترتیب از بیشترین به کمترین شامل: حلزون خوراکی>دو کفه‌ای اویستر>صدف کلم>ملوک، بود که بیشترین میزان در بین عصاره‌ها مربوط به عصاره اتانولی بود و عصاره‌های ۴ گونه نرم‌تن در تمامی مدل‌های مورد مطالعه سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دادند. بنابراین، می‌توانند به عنوان منابع مورد استفاده جهت تأمین منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی باشند و در نهایت بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های انجام شده، مربوط به شکم پا حلزون خوراکی بود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات کارشناس شرکت سنجش پاسارگاد تهران که امکانات و تجهیزات آزمایشی را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

مهدی آبکنار، ع. ۱۴۰۰. بررسی تغییرات فصلی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Nizamuddinia zanardinii* قبل و بعد از مانسون در سواحل شمالی دریای عمان. مجله علمی شیلات ایران، ۳۰(۵): ۹۹-۱۱۰. DOI: 20.1001.11261354.1400.30.5.8.1.

Alexandru, V., Balan, M., Gaspar, A., Craciunescu, O. and Moldovan, I., 2007. Studies on the antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Romanian medicinal plants used for wound healing. *Biotechnology Letter*, 12(6):3467-3472.

Arnao, M.B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Science and Technology*, 1(11):419-421. DOI:10.1016/S0924-2244(01)00027-9

Amsler, Ch.D ., McClintock, J.D. and Baker, B.J., 2001. Secondary Metabolites as Mediators of Trophic Interactions among Antarctic Marine Organisms. American Zoologist, 41(1), 17-26.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1999. Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay. In: Packer L (ed) Oxidants and Antioxidants Volume 299 of Methods in Enzymology. Academic Press, Orlando, pp 15–27.

Harborne, J.B., 1998. Phytochemical Methods a guide to modern techniques of plant analysis. London, New York. 295p.

Jayaprakash, G.K., Singh, R.P. and Sakariah, K.K., 2001. Antioxidant activity of grape seed extracts on per oxidation models in vitro. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 55:1018-1022. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00298-3

Kanchana, S., Arumugam, M., Giji, S. and Balasubramanian, T., 2013. Isolation, characterization and antioxidant activity of

hyaluronic acid from marine bivalve mollusk *Amussium pleuronectus* (Linnaeus, 1758). *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(1): 1-7. DOI: 10.1016/j.bcdf.2013.06.001.

Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., Kinsella, J.E., 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agriculture Food Chemistry*.42:64-69.

Lagouri,V. and Boskou, D., 1996. Nutrient antioxidants in origano. *International Journal of Food Science Nutrient*, 47:493-497. DOI: 10.3109/09637489609031878.

Nazeer, R. and Naqash, S.Y., 2013. *In vitro* antioxidant activity of two molluscs, *Loligo duvauceli* Orbigny and *Donax cuneatus* Linnaeus, by solvent extraction methods. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6(1): 17-21. DOI: 10.1007/s12349-011-0088-1

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.DOI:10.5264/eiyogakuzashi.44.307

Pachaiyappan, Y.,Muthuvel, A.,Sadhasivam,G., Vidhya Sankar,V.J., Sridhar,N.and Kumar,M., 2014. In vitro antioxidant activity of different Gastropods, Bivalves and Echinoderm by Solvent Extraction method. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(6):2539-2545. DOI:10.13040/IJPSR.0975-8232.5 (6).2529-45

Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337–341. DOI:10.1006/abio.1999.4019

Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53(8):3101–3113. DOI:10.1021/jf0502698

Qiao, D., Ke, C., Hu, B., Luo, J., Ye, H., Sun, Y. and Zeng, X., 2009. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate polymers*, 78(2):199-204.

Rajesh, M., Nagarajan, A.,Perumal, S. and Sellamuthu, M., 2008. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis*, *Ficus bengalensis* and *Ficusracemosa*. *Food Chemistry*, 107:1000–1007. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.09.008

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans,C., 1992. Antioxidant activity applying an improvedABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology*, 26: 1231–1237. DOI:10.1016/j.carbpol.2009.03.018

Ridzwan, B.H., Kaswandi, M.A., Azman, Y.and Fuad, M., 1995. Screening for antibacterial agents in three species of sea

cucumbers from coastal areas of Sabah. *General Pharmacology*, 26: 1539–1543. DOI:10.1016/0306-3623(95)00041-0.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K.and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6),945-48. DOI: 10.1021/jf00018a005

Shimoji, Y., Tamura, Y., Nakamura, Y., Nanda, K.,. Nishidai , Sh., Nishikawa, Y., Kazuo, N., Ishihara, N., Uenakai, K. and Ohigashi, H. 2002. Isolation and Identification of DPPH Radical Scavenging Compounds in Kurosu (Japanese Unpolished Rice Vinegar). *Journal of agricultural and food chemistry*, 50,6501-6503. DOI: 10.1021/jf020458f

Singleton, V.L., and Rossi, J.A., 1965. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungtic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.

Comparison of antioxidant activity and phenolic content of ethanolic, aqueous, and hydro-ethanolic extracts from four species of marine mollusk in the Qeshm coast

Akbary P.[1*]; Daliran S.[1]; Meftah Zehi A.[1]

*paria.akbary@gmail.com

1-Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

Abstract

This study compares the antioxidant activity and phenolic content of extracts of four mollusk species (Oyster rock bivalve; Saccostrea cuculate, cabbage bivalve; *Callista umbonella* and Molok or cylindrical clam; *Solen vagina* and edible snail; *Ampullaria cuprina*) and determine the best mollusk in Qeshm coast. Mollusc species (n=100 for each mollusk) were stored in cold boxes with ice and transferred to the laboratory after collection. The samples were well ground and aqueous, ethanolic (90% ethanol) and hydro-ethanolic (50:50) extracts were prepared from them. The results showed that the highest amount of phenolic content (81.66 mg GAE/g extract), diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) antiradical activity (1722.66 µmol Trolex /g extract) and antiradical activity equivalent to Trolex (649.33 µmol Trolex/g) extract) was observed in the ethanolic extract of edible snail. Also, the amount of antioxidant activity was maximum in three methods: PMP, 606.66 µmol Trolex, FRAP: (740 µmol iron/ gram of extract and RP: 1.24 in edible snail. Aqueous, ethanolic and hydro-ethanolic extracts of four Mollusca species showed different levels of antioxidant activity in all studied models. In general, ethanolic extract of edible snail showed the best antioxidant activity and phenolic content, which can be considered as rich sources of natural antioxidants for food usage is recommended

Keywords: Antioxidant acitivity, phenol, *Saccostrea cuculate,Callistaumbonella, Solen vagina,Ampullaria cuprina*

Corresponding author