(DOI): 10.22092/ISFJ.2025.133032 33(6) 67-81 Iranian Scientific Fisheries Journal

Effect of solvent type on extraction efficiency and antioxidant properties of polyphenols and alginate from brown seaweeds *Sargassum cristaefolium* and *Nizimudinia zanardinii* collected from the northern coasts of the Oman Sea

Sharifian S.[1*]; Nazemi M.[2]

*sharifian.salim@hotmail.com

1-Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
2-Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

Received: January 2025 Accepted: February 2025 Published: March 2025

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Introduction

Among all marine organisms, seaweeds are considered as one of the sources of bioactive compounds. The most important compounds found in brown seaweed include phenolic compounds, polysaccharides, polyunsaturated fatty acids, proteins, peptides, pigments, vitamins, terpenoids and sterols (Sadeghi *et al*., 2024). Phlorotannins are compounds containing a benzene ring with one or more hydroxyl group substitutions, which are found only in brown seaweeds. So far, more than 150 algal polyphenol structures have been reported (Asaduzzaman *et al*., 2020). Reports indicate that these compounds have several medicinal properties such as antimicrobial and antioxidant (Milledge *et al*., 2015). Phycocolloids or hydrocolloids are another group of bioactive compounds found in brown seaweeds. The most important hydrocolloids found in seaweeds include alginate, agar, and carrageenan (Cmikova *et al*., 2022). *Sargassum cristaefolium* and *Nizimudinia zanardinii* are brown seaweeds species with good distribution on the southern coasts of Iran that can be considered as potential options for investigating the presence of compounds with antioxidant and functional properties. Therefore, the objectives of the present study included 1) extraction of bioactive compounds (including phenolic compounds and alginate) using different solvents and 2) investigation of the extraction efficiency and antioxidant properties of the extracted compounds.

Methodology

Brown seaweeds *S. cristaefolium* and *N. zanardinii* were collected from the Chabahar coast, washed and dried in the shade. Extraction was performed using methanol (100%, 70%, and 30%), ethyl acetate (100%, 70%, and 30%) and water (100%) and the extraction yield, phlorotannins content, DPPH free radical scavenging activity and copper chelating ability of different extracts were measured. To purify phenolic compounds in *N. zanardinii*, the methanol extract was fractionated using chloroform, dichloromethane and ethyl acetate solvents. Alginate was extracted using distilled water and the

residue obtained from the extraction in the previous section was used for extraction. Total phenol content was measured based on the standard phloroglucinol (PHG) and using the Folin-Ciocalteu indicator. DPPH free radical scavenging activity was measured according to the method of Shimada *et al*. (1992). Cupric chelating ability of different extracts was measured according to the method mentioned by Wong et al. (2006).

Results

In *S. cristaefolium*, among the different treatments, the highest extraction yield was obtained in 70% methanol solvent (5.50 g/100 g), while in *N. zanardinii* the highest yield was in 100% methanol solvent and equal to 43.6 g/100 g seaweed. The extract yield in *N. zanardinii* was higher than *S. cristaefolium* in most treatments. In both seaweeds, the highest phlorotannins content was observed in 100% ethyl acetate treatment and the lowest in 100% water treatment. The highest DPPH scavenging activity was obtained in 100% ethyl acetate treatment of *N. zanardinii* at 84.38%. The lowest DPPH scavenging activity was observed in 100% water extract. Among the different fractions, the highest extraction yield by weight was associated with the ethyl acetate fraction (2.54 g). The highest amount of phlorotannins, i.e. 19.14 mg phloroglucinol/g extract, was found in the ethyl acetate fraction, while the lowest amount (1.35 mg PHG/g) was found in the chloroform fraction. The highest radical scavenging activity, 98.95%, was found in the ethyl acetate fraction. When comparing the fractions with the first extract, only the cupric chelation rate in the ethyl acetate fraction (73.44%) was higher than in the first extract (43.45%), and lower chelating ability was observed in the other fractions.

Discussion and conclusion

In the present study, organic solvents in pure form were more effective than those mixed with water in both *S. cristaefolium* and *N. zanardinii*. These results are in agreement with the study of El-Sheekh *et al*. (2023) who reported that the extraction yield and antioxidant properties varied depending on the type of solvent and seaweed species, and in most species, the highest yield and antioxidant properties were in methanol extracts. The results of purification of the first extract of *N. zanardinii* using different solvents showed that the ethyl acetate fraction had a higher phlorotannins content, DPPH free radical scavenging activity, and cupric chelating ability than other fractions. Previous studies show that ethyl acetate has a better ability to separate phenolic compounds, especially phlorotannins, from the first extract compared to other solvents (Sadeghi *et al*., 2024). Therefore, it seems that the higher antioxidant properties in this fraction were due to the accumulation of polyphenols in it (Chakraborty *et al*., 2015). In the present study, the amount of alginate extracted from *N. zanardinii* was higher than in similar studies and the extracted alginate had a good ability to chelate cupric ions. This property was probably due to the high ability of alginate to form gels and subsequently increase the viscosity of the solution and trap ions (Jayakody *et al*., 2020). In general, the results of this study showed that the type of solvent had a significant effect on the extraction yield of phenolic compounds and alginate from brown seaweed, and the amount of these compounds and their antioxidant properties varied depending on the species and extraction conditions.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgment

We sincerely appreciate and thank all the experts at the Central Laboratory of Chabahar Maritime University and the Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center who helped us in conducting this research.

مجله علمی شیلات ایران ۳۳ (٦) ٦٧-٨١ (DOI): 10.22092/ISFJ.2025.133032

مقاله علمی – پژوهشی:

تاثیر نوع حلال بر میزان بازده استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها و آلژینات از جلبک‌های قهوه‌ای *Sargassum cristaefolium* و *Nizimudinia zanardinii* جمع‌آوری شده از سواحل شمالی دریای عمان

سلیم شریفیان*[۱]، ملیکا ناظمی[۲]

*sharifian.salim@hotmail.com

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

۲- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۳ تاریخ چاپ: اسفند ۱۴۰۳

چکیده

در مطالعه حاضر تاثیر نوع حلال بر میزان بازده استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها و آلژینات استخراجی از جلبک‌های قهوه‌ای *Sargassum cristaefolium* و *Nizimudinia zanardinii* جمع‌آوری شده از سواحل شمالی دریای عمان مورد بررسی قرار گرفت. جلبک‌های قهوه‌ای از سواحل چابهار جمع‌آوری، شستشو و در سایه خشک گردید. در ادامه استخراج عصاره از جلبک‌ها با استفاده از حلال‌های متانول (۱۰۰، ۷۰ و ۳۰ درصد)، اتیل استات (۱۰۰، ۷۰ و ۳۰ درصد) و آب (۱۰۰ درصد) انجام شده و میزان استخراج عصاره، میزان فلوروتانین، توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH و توانایی کلاته‌کنندگی مس در عصاره‌های مختلف سنجش گردید. نتایج نشان داد که نوع حلال (متانول یا اتیل استات) و نسبت ترکیب آن (۷۰، ۳۰ و صفر درصد) با آب تأثیر زیادی بر میزان استخراج عصاره، فلوروتانین، آلژینات و خواص آنتی‌اکسیدانی آنها دارد. در هر دو جلبک، حلال‌های آلی در شکل خالص کارایی بهتری نسبت به شکل ترکیب با آب داشتند. نتایج مقایسه دو جلبک نیز نشان داد که جلبک *N. zanardinii* نسبت به *S. cristaefolium* دارای میزان فلوروتانین، آلژینات و خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری بوده است. بنابراین، از جلبک *N. zanardinii* و عصاره حاصل از حلال متانول ۱۰۰ درصد برای استخراج فلوروتانین و در ادامه آلژینات استفاده گردید. نتایج ادامه پژوهش نشان داد که در فرکشن‌های مختلف حاصله از عصاره اولیه جلبک *N. zanardinii*، فرکشن اتیل‌استاتی دارای میزان فلوروتانین، مهار رادیکال آزاد و کلاته‌کنندگی یون مس بالاتری نسبت به سایر فرکشن‌ها بوده است. به طور کلی، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نوع حلال تاثیر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و آلژینات از جلبک قهوه‌ای دارد و میزان این ترکیبات و خواص آنتی‌اکسیدانی آنها بسته به نوع گونه و شرایط استخراج متفاوت است.

لغات کلیدی: پلی‌فنول‌ها، آلژینات، جلبک‌های قهوه‌ای، دریای عمان

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

در میان تمام جانداران دریایی، جلبک‌ها به عنوان یکی از منابع قابل استخراج از نظر غذاهای کاربردی و دارای ترکیبات فعال فراسودمند در نظر گرفته می‌شوند (Cmikova *et al*., 2022). جلبک‌ها گیاهان پرسلولی هستند که در بستر دریا رشد می‌کنند. این گیاهان به صورت گسترده در جنوب شرق آسیا، اروپا و آمریکا به عنوان غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sadeghi *et al*., 2024). جلبک‌ها به دلیل میزان پایین کالری و میزان بالای ویتامین‌ها مواد معدنی، پروتئین‌ها، پلی‌فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها و فیبرها از لحاظ تغذیه‌ای بسیار سودمند هستند (Cotas *et al*., 2020). علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، این گیاهان دارای استفاده‌های صنعتی، دارویی، آرایشی نیز هستند. جلبک‌های دریایی براساس نوع رنگدانه موجود در آنها به سه گروه قهوه‌ای، سبز و قرمز تقسیم‌بندی می‌گردند. جلبک‌های قهوه‌ای در مقایسه با جلبک‌های سبز و قرمز دارای میزان بالاتری از ترکیبات زیست‌فعال هستند (Liu, 2015). مهم‌ترین ترکیبات موجود در جلبک‌های قهوه‌ای شامل ترکیبات فنولی، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها، پپتیدها، رنگدانه‌ها، ویتامین‌ها، ترپنوئیدها و استرول‌هاست (Emu *et al*., 2023).

پلی‌فنول‌ها ترکیباتی دارای یک حلقه بنزن با یک یا چند استخلاف گروه هیدروکسیل هستند که ساختار طبیعی آنها می‌تواند از مولکول‌های ساده‌ای مانند اسید فنولیک تا ترکیبات پیچیده‌ای مانند تانین‌ها متغیر باشد. اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها دو گروه مهم از پلی‌فنول‌های تغذیه‌ای (موجود در مواد غذایی) هستند (Asaduzzaman *et al*., 2020). تاکنون بیش از ۱۵۰ ساختار پلی‌فنولی جلبکی گزارش شده است. گزارش‌ها نشان می‌دهد که این ترکیبات دارای خصوصیات دارویی متعددی از قبیل ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضدHIV ، ضد دیابت، ضد التهاب و ضد آلرژی هستند (Cmikova *et al*., 2022). فیکوکلوئیدها یا هیدروکلوئیدها گروهی دیگر از ترکیبات زیست‌فعال هستند که در جلبک‌های قهوه‌ای یافت می‌شوند. این ترکیبات، پلی‌ساکاریدهایی با وزن مولکولی بالا هستند که عمدتاً از قندهای ساده تشکیل شده‌اند. مهم‌ترین هیدروکلوئیدهای موجود در جلبک‌ها شامل آلژینات (E400)، آگار (E406) و کاراژینان (E407) است. آلژینات‌ها پلیمرهای هیدروکلوئیدی با وزن مولکولی ۱۲۰۰۰-۱۸۰۰۰۰ دالتون هستند که به دو شکل اسیدی و نمکی عمدتاً از جلبک‌های قهوه‌ای استخراج می‌گردند (Milledge *et al*., 2015). واحدهای سازنده این ترکیبات دی مونورونیک و اِل-گلورونیک اسید است. این پلیمرها با یون‌های کلسیم واکنش می‌دهند و ژل‌های پایداری را ایجاد می‌کنند. آلژینات از دسته پلیمرهای تأیید شده در سازمان غذا و دارو ایالات متحده (FDA) بوده که دارای برخی از مهم‌ترین ویژگی‌های مواد زیستی است به‌طوری‌که نه‌تنها در صنایع غذایی و آرایشی بلکه در سایر صنعت‌ها از قبیل چرم‌سازی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پلیمرها در تولید محصولات پزشکی از قبیل چسب زخم نیز کاربردهای فراوانی دارد. تولید سالانه آلژینات حدود ۳۰۰۰۰ تن تخمین زده می‌شود (Bojorges *et al*., 2023).

طی تحقیقات انجام شده تاکنون بیش از ۲۵۰ گونه جلبک در سواحل جنوب کشور شناسایی شده است (Eghbal *et al*., 2020). جلبک‌های *Sargassum cristaefolium* و *Nizimudinia zanardinii* از گونه‌های جلبکی قهوه‌ای با پراکنش خوب در سواحل جنوبی ایران است که عموماً از آنها در تهیه سوپ و برخی دیگر از فرآورده‌های دریایی استفاده می‌گردد (Taheri, 2016). این دو گونه جلبک با توجه به پراکنشی که در جنوب ایران به‌ویژه در سواحل دریای عمان دارند، می‌توانند به عنوان گزینه‌های بالقوه برای بررسی وجود ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی و کاربردی مطرح باشند. از این‌رو، اهداف پروژه حاضر شامل (۱) استخراج ترکیبات زیست فعال (ترکیبات فنولی و آلژینات) با استفاده از حلال‌های مختلف و (۲) بررسی بازده استخراج و خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات استخراجی بوده است.

مواد و روش کار

جمع‌آوری جلبک و عصاره‌گیری

گونه‌های جلبک *S. cristaefolium* و *N. zanardinii* به صورت دستی در فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰ از منطقه بین جزر و مدی سواحل شهر چابهار جمع‌آوری و به آزمایشگاه دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل گردید. نمونه‌ها جهت پاک شدن گل‌ولای و سایر رسوبات با آب شیرین شستشو و جهت خشک شدن در سایه قرار داده شد. پس از خشک شدن، نمونه‌ها در ابتدا با با خردکن خانگی Philips (ساخت ژاپن) پودر و در ادامه در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار بسته بندی و تا هنگام عصاره‌گیری در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید. برای عصاره‌گیری از حلال‌های متانول ۱۰۰ درصد، متانول ۷۰ درصد، متانول ۳۰ درصد، آب ۱۰۰ درصد، اتیل‌استات ۱۰۰ درصد، اتیل‌استات ۷۰ درصد، اتیل‌استات ۳۰ درصد استفاده گردید. در ابتدا ۱۰۰ گرم جلبک، توزین و با نسبت ۱ به ۵ (وزنی-حجمی) با حلال مورد نظر مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در شیکر قرار داده شد. در ادامه عصاره حاصل از هر تیمار با کمک کاغذ صافی از مواد جلبکی جدا گردید. محلول حاصل پس از کاهش حلال با استفاده از دستگاه تبخیرکننده تحت خلأ (روتاری اواپوراتور) به عنوان عصاره اولیه در نظر گرفته شد. برای خالص‌سازی ترکیبات فنولی، ابتدا به عصاره اولیه به میزان ۱/۴ حجم محلول، آب مقطر دوبار تقطیر اضافه گردید، سپس به ترتیب با کلروفرم، دی کلرومتان و اتیل استات (هر حلال سه بار) شستشو داده شد. محلول‌های حاصل از هر بار شستشو به کمک قیف جداکننده از هم جدا گردید. محلول انتهایی به عنوان، محلول آبی در نظر گرفته شد. عصاره‌های حاصل از هر محلول پس از تبخیر حلال، جمع‌آوری و تا هنگام آزمایش در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Gall *et al*, 2015).

استخراج آلژینات

استخراج آلژینات از گونه‌های جلبکی با استفاده از آب مقطر و تفاله حاصله از عصاره‌گیری در بخش قبل و بر اساس روش کار Rostami و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد. به ۵۰ گرم تفاله جلبک حاصل شده از مرحله قبل، ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل شده اضافه و به مدت سه ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر حرارتی قرار داده شد. این فرایند، دو بار دیگر تکرار و تفاله‌های هر سه بار انجام آزمایش با کمک سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه؛ ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری گردید. به تفاله حاصله تا حجم یک لیتر آب مقطر و در ادامه ۳ درصد Na_2CO_3 اضافه و pH بر ۱۱ تنظیم گردید. مخلوط حاصله سانتریفیوژ و برابر با حجم بخش مایع جدا شده به آن اتانول ۷۰ درجه اضافه و پس از گذشت ۱۲ ساعت رسوبات ته‌نشین شده به عنوان آلژینات جداسازی شد. برای حذف آب، آلژینات حاصله چندین بار با آب و استون شستشو و پس از خشک شدن در زیر هود، جمع‌آوری گردید.

فنل کل

میزان فنول کل بر اساس استاندارد فلوروگلوسینول (Phloroglucinol, PHG) و با استفاده از شناساگر فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) به روش Singleton و همکاران (۱۹۹۹) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه (۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر شناساگر فولین سیوکالتو (۱۰ درصد در آب مقطر) در لوله‌های پوشیده درب‌دار مخلوط و پس از ۳ دقیقه، ۳ میلی‌لیتر بیکربنات سدیم ۱ درصد اضافه و همگن گردید. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در تاریکی انکوبه گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر ثبت شد. برای کالیبرلاسیون و رسم منحنی استاندارد از محلول فلوروگلوسینول (غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر) استفاده شد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH[1]

سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بر اساس روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) انجام گرفت (شکل ۵). به طور خلاصه، ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (۷۵ میکرومولار)

[1] 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

با ۱ میلی‌لیتر عصاره (۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) مخلوط و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از ۳۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به صورت معادله ذیل محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH} = 1 - \frac{A_0 - A_1}{A_0}$$

A_0 و A_1 به‌ترتیب جذب کنترل محلول و جذب عصاره است. برای مقایسه از آلفا-توکوفرول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

توانایی کلاته‌کنندگی مس

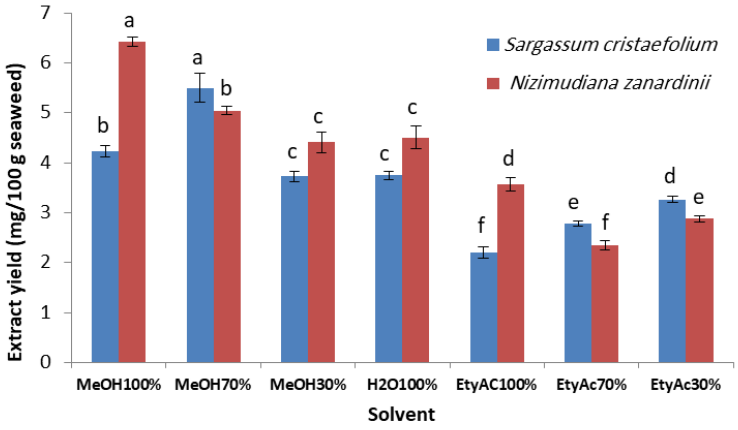
سنجش توانایی کلاته‌کنندگی عصاره‌های مختلف بر اساس روش Wong و همکاران (۲۰۰۶) انجام گرفت. در ابتدا عصاره در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با بافر هگزامین-HCl (۱۰ میلی مولار با pH =۵) مخلوط گردید. یک میلی‌لیتر از مخلوط آماده شده با ۱ میلی‌لیتر سولفات مس II (۰/۴ میکرومولار)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول TMM (۲ میلی مولار) مخلوط و میزان جذب در ۴۶۰ و ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید. در ادامه پس از محاسبه نسبت جذب با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار کلاته‌کنندگی بر اساس درصد کلاته کنندگی یون‌های مس گزارش گردید.

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

برای رسم نمودارها از نرم‌افزار مایکروسافت اکسل (۲۰۱۰) استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰۱۹) انجام شد. برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین میانگین متغیرهای مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی در سطح ۵ درصد استفاده گردید. تمامی داده‌ها به صورت میانگین حاصل از سه تکرار همراه با انحراف معیار گزارش گردید.

نتایج

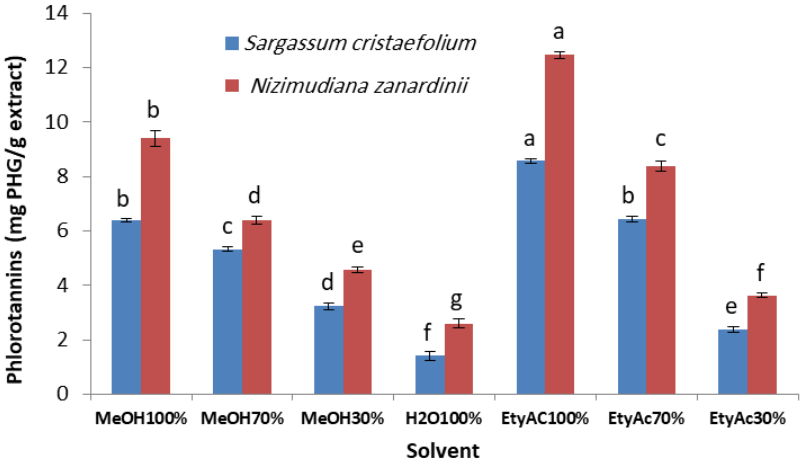
میزان استخراج عصاره (گرم/ ۱۰۰ گرم جلبک) از جلبک‌های قهوه‌ای *S. cristaefolium* و *N. zanardinii* با استفاده از نسبت‌های مختلف حلال‌های متانول و اتیل استات در شکل ۱ نشان داده شده است. در جلبک *S. cristaefolium*، در میان تیمارهای مختلف بالاترین میزان استخراج عصاره با ۵/۵۰ گرم در حلال متانول ۷۰ درصد به‌دست آمد درحالی‌که در جلبک *N. zanardinii* بالاترین میزان عصاره در حلال متانول ۱۰۰ درصد به میزان ۶/۴۳ گرم وجود داشت. در هر دو جلبک، حلال متانول در مقایسه با اتیل استات کارایی بهتری در استخراج عصاره داشت. در مقایسه دو جلبک، میزان عصاره در جلبک *N. zanardinii* نسبت به *S. cristaefolium* در اکثر تیمارها بالاتر بود.



شکل ۱: میزان استخراج عصاره (گرم/ ۱۰۰ گرم جلبک) از جلبک‌های قهوه‌ای *Sargassum cristaefolium* و *Nizimudiana zanardinii*
(MeOH: متانول، H_2O: آب، EtyAc: اتیل‌استات)

Figure 1: Extraction yield (gram/ 100 gram seaweed) from brown seaweeds *Sargassum cristaefolium* and *Nizimudiana zanardinii* (MeOH: methanol, H_2O: water, WtyAc: ethyl acetate)

میزان فلوروتانین بر حسب میلی‌گرم فلوروگلوسینول در عصاره‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای *S. cristaefolium* و *N. zanardinii* در شکل ۲ نشان داده شده است. در هر دو جلبک بالاترین میزان فلوروتانین در تیمار اتیل استات ۱۰۰ درصد و کمترین آن در تیمار آب ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. از نظر مقایسه دو حلال متانول و اتیل استات، در هر دو جلبک میزان فلوروتانین در عصاره‌های استخراجی با اتیل استات نسبت به متانول بالاتر بود. در مقایسه دو جلبک، میزان فلوروتانین در تمامی حلال‌ها در جلبک *N. zanardinii* نسبت به *S. cristaefolium* بالاتر بود.



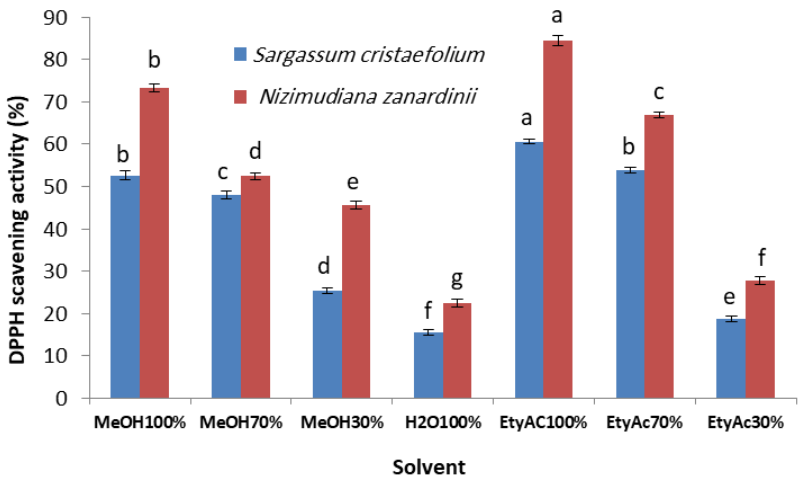
شکل ۲: میزان فلوروتانین (میلی‌گرم فلوروگلوسینول/گرم عصاره) در عصاره‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای *Sargassum cristaefolium* و *Nizimudiana zanardinii* (MeOH: متانول، H_2O: آب، EtyAc: اتیل‌استات)

Figure 2: Phlorotannin content (milligram Phloroglucinol/ gram extract) in the extracts of brown seaweeds *Sargassum cristaefolium* and *Nizimudiana zanardinii* (MeOH: methanol, H_2O: water, WtyAc: ethyl acetate)

میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (درصد) در عصاره‌های مختلف به‌دست آمده از جلبک‌های قهوه‌ای *S. cristaefolium* و *N. zanardinii* در شکل ۳ نشان داده شده است. بالاترین میزان مهار، به میزان ۸۴/۳۸ درصد در تیمار اتیل استات ۱۰۰ درصد جلبک *N. zanardinii* به‌دست آمد. در عصاره‌های استخراجی از جلبک *S. cristaefolium* نیز بالاترین میزان مهار در عصاره استخراجی با اتیل استات ۱۰۰ درصد به میزان ۶۰/۶۳ درصد ثبت گردید. در مقایسه دو حلال، عصاره‌های استخراجی با اتیل استات در هر دو جلبک، توانایی بیش‌تری در مهار رادیکال آزاد داشتند. در هر دو جلبک، کمترین میزان مهار در عصاره‌های استخراجی با آب ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. از نظر نوع گونه، در تمامی تیمارها، میزان مهار رادیکال آزاد در *N. zanardinii* نسبت به *S. cristaefolium* بالاتر بود.

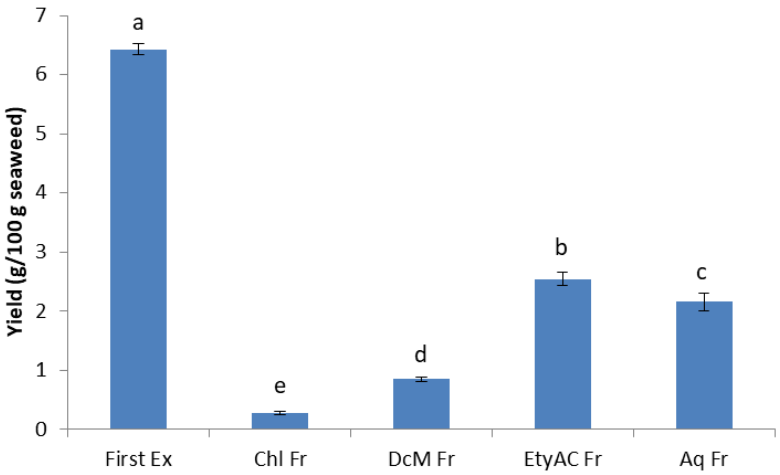
نتایج نوع حلال و گونه‌های مورد آزمایش نشان داد که جلبک *N. zanardinii* در مقایسه با *S. cristaefolium* و حلال‌های اتیل استات و متانول به شکل خالص (۱۰۰ درصد) در مقایسه با ترکیب آنها با آب یا آب خالص، کارایی بهتری داشته است. از این‌رو، ادامه آزمایش‌ها، با توجه به نتایج قبلی، در دسترس و ارزان‌تر بودن و سمیت کمتر متانول در مقایسه با اتیل استات، با استفاده از متانول ۱۰۰ درصد و گونه *N. zanardinii* انجام گرفت.

میزان استحصال فراکشن‌های مختلف از عصاره اولیه متانولی جلبک *N. zanardinii* با استفاده از روش استخراج مایع-مایع و با کمک حلال‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. در میان فراکشن‌های مختلف، از نظر وزنی بالاترین میزان استخراج، مرتبط با فراکشن اتیل استاتی و به میزان ۲/۵۴ گرم بود.



شکل ۳: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (درصد) در عصاره‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای ***Sargassum cristaefolium*** و ***Nizimudiana zanardinii*** (MeOH: متانول، H_2O: آب، EtyAc: اتیل‌استات)

Figure 3: DPPH radical scavenging activity (percentage) in the extracts of brown seaweeds *Sargassum cristaefolium* and *Nizimudiana zanardinii* (MeOH: methanol, H_2O: water, WtyAc: ethyl acetate)

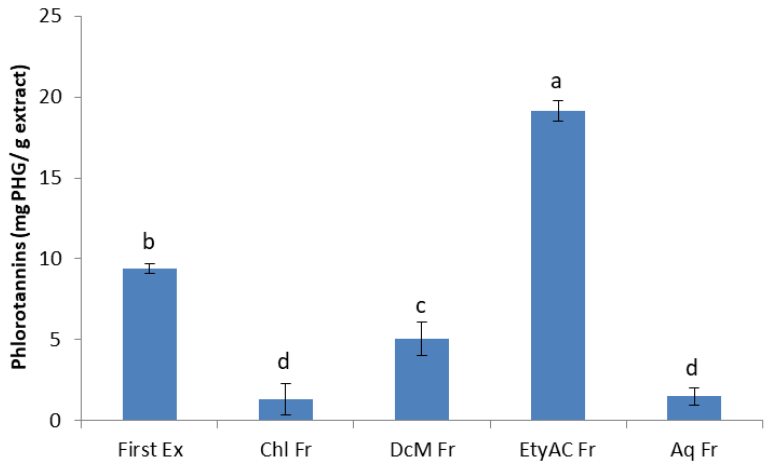


شکل ۴: میزان استحصال (گرم در ۱۰۰ گرم جلبک) فراکشن‌های مختلف از عصاره متانولی جلبک ***Nizimudiana zanardinii*** (First Ex: عصاره اولیه، Chl Fr: فراکشن کلروفرمی، DcM Fr: فراکشن دی‌کلرومتانی، EtyAC Fr: فراکشن اتیل‌استاتی، Aq Fr: فراکشن آبی)

Figure 4: Extraction yield (g/ 100 g seaweed) of different fractions from methanolic extract of *Sargassum cristaefolium* (First Ex: First extract, Chl Fr: Chloroform fraction, DcM Fr: Dichloromethane fraction, EtyAC Fr: Ethyl acetate fraction, Aq Fr: Aqueous fraction)

در ادامه بیش‌ترین میزان استخراج به‌ترتیب در فراکشن آبی، دی کلرومتانی و کلروفرمی مشاهده گردید.

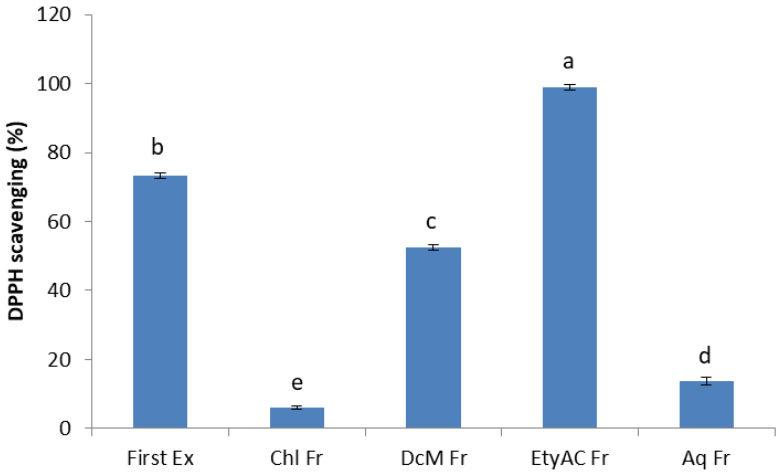
مقدار فلوروتانین (میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره) در فراکشن‌های مختلف استخراجی از عصاره متانولی جلبک *N. zanardinii* در شکل ۵ نشان داده شده است. بالاترین میزان فلوروتانین یعنی ۱۹/۱۴ میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره در فراکشن اتیل استاتی وجود داشت جایی‌که کمترین میزان آن (۱/۳۵) در فراکشن کلروفرمی ثبت گردید. به‌جز از فراکشن اتیل استاتی، میزان فلوروتانین در سایر فراکشن‌ها نسبت به عصاره اولیه متانولی (۹/۳۹) کمتر بود.



شکل ۵: میزان فلوروتانین (میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره) فراکشن‌های مختلف از عصاره متانولی جلبک *Nizimudiana zanardinii* (First Ex: عصاره اولیه، Chl Fr: فراکشن کلروفرمی، DcM Fr: فراکشن دی‌کلرومتانی، EtyAC Fr: فراکشن اتیل‌استاتی، Aq Fr: فراکشن آبی)

Figure 4: Extraction yield (gram/ 100 gram seaweed) of different fractions from methanolic extract of *Sargassum cristaefolium* (First Ex: First extract, Chl Fr: Chloroform fraction, DcM Fr: Dichloromethane fraction, EtyAC Fr: Ethyl acetate fraction, Aq Fr: Aqueous fraction)

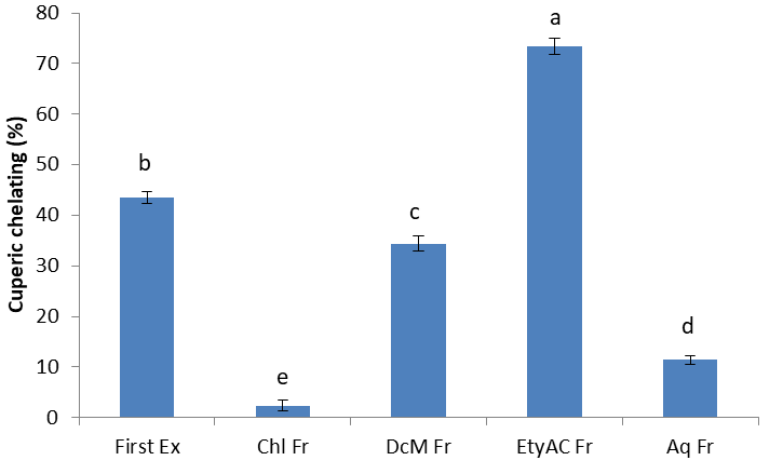
میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در فراکشن‌های مختلف استخراجی از عصاره متانولی جلبک *N. zanardinii* در شکل ۶ نشان داده شده است. بالاترین میزان مهار رادیکال به مقدار ۹۸/۹۵ درصد در فراکشن اتیل استاتی وجود داشت. در ادامه میزان مهار رادیکال آزاد در فراکشن‌های دی کلرومتانی، آبی و کلروفرمی به‌ترتیب برابر ۵۲/۵۲، ۱۳/۶۶ و ۵/۹۸ درصد اندازه‌گیری شد که نسبت به عصاره اولیه متانولی (۷۳/۲۷ درصد) کمتر بود.



شکل ۶: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (درصد) در فراکشن‌های مختلف از عصاره متانولی جلبک *Nizimudiana zanardinii* (First Ex: عصاره اولیه، Chl Fr: فراکشن کلروفرمی، DcM Fr: فراکشن دی‌کلرومتانی، EtyAC Fr: فراکشن اتیل‌استاتی، Aq Fr: فراکشن آبی)

Figure 6: DPPH free radical scavenging (percentage) of different fractions from methanolic extract of *Sargassum cristaefolium* (First Ex: First extract, Chl Fr: Chloroform fraction, DcM Fr: Dichloromethane fraction, EtyAC Fr: Ethyl acetate fraction, Aq Fr: Aqueous fraction)

در شکل ۷ توانایی کلاته کنندگی مس (درصد) فراکشن‌های مختلف استخراجی از عصاره متانولی جلبک *N. zanardinii* نشان داده شده است. در مقایسه فراکشن‌ها با عصاره اولیه، تنها میزان کلاته کنندگی در فراکشن اتیل استاتی (۷۳/۴۴ درصد) نسبت به عصاره اولیه (۴۳/۴۵ درصد) بالاتر بود و در سایر فراکشن‌ها، توانایی کلاته‌کنندگی کمتری مشاهده شد. کمترین توانایی کلاته کنندگی در فراکشن کلروفرمی به میزان ۲/۳۴ درصد وجود داشت.



شکل ۷: توانایی کلاته کنندگی مس (٪) فراکشن‌های مختلف از عصاره متانولی جلبک *Nizimudiana zanardinii* (First Ex: عصاره اولیه، Chl Fr: فراکشن کلروفرمی، DcM Fr: فراکشن دی‌کلرومتانی، EtyAC Fr: فراکشن اتیل‌استاتی، Aq Fr: فراکشن آبی)

Figure 7: Cupric chelating activity (%) of different fractions from methanolic extract of *Sargassum cristaefolium* (First Ex: First extract, Chl Fr: Chloroform fraction, DcM Fr: Dichloromethane fraction, EtyAC Fr: Ethyl acetate fraction, Aq Fr: Aqueous fraction)

میزان استحصال آلژینات با استفاده آب مقطر به عنوان حلال از جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii* و خواص آنتی‌اکسیدانی آن شامل میزان فنول، توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH و توانایی کلاته‌کنندگی مس در جدول ۱ ارائه شده است. میزان استحصال آلژینات برابر با ۴/۷۳ گرم از هر ۱۰۰ گرم جلبک بود. میزان فنول در آلژینات برابر با ۴/۶۴ میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم به‌دست آمد. توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH و کلاته‌کنندگی یون مس در آلژینات‌های استخراجی به‌ترتیب برابر ۲۳/۰۷ و ۴۳/۴۷ درصد محاسبه گردید.

جدول ۱: میزان استحصال و خواص آنتی‌اکسیدانی آلژینات استخراج شده از جلبک *Nizimudiana zanardinii*

Table 1: Yield and antioxidants properties of alginate extracted from *Nizimudiana zanardinii*

Cupric chelating (%)	DPPH scavenging (%)	Phenol content*	Yield (%)	
0.99 ±43.47	1.67 ±23.07	0.41 ±6.64	0.38 ±4.73	Alginate

* میزان فنول (میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم نمونه)

غلظت مورد استفاده در آزمایش‌های خواص آنتی‌اکسیدانی ۱ میلی‌گرم آلژینات در هر میلی‌لیتر محلول است.

*Phenol content is expressed as milligram Phloroglucinol per gram of sample

The concentration used in antioxidant tests was 1 milligram of alginate per milliliter of solution

بحث

میزان استخراج عصاره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی به میزان زیادی در ارتباط با روش استخراج است. روش‌های استخراج ترکیبات فنولی از جلبک‌های دریایی را می‌توان به دو گروه سنتی (به کمک حلال‌های آلی و آب) و نوین (با استفاده از آنزیم، مایکروویو، مایع فوق بحرانی و فشار)، تقسیم‌بندی نمود. با توجه به هزینه‌های بالا و

دسترسی پایین در روش‌های نوین، استفاده از حلال‌های آلی به شکل خالص یا در ترکیب با آب، تاکنون مرسوم‌ترین روش عصاره‌گیری از گونه‌های مختلف جلبک‌های دریایی و سایر گیاهان دارویی بوده است (El-Sheekh *et al*., 2023). با این‌حال، باید ذکر نمود که با توجه به گستردگی گونه در بین جلبک‌های دریایی و پیچیده بودن ترکیبات زیست‌فعال موجود در آنها، تعیین یک روش و حلال مناسب و یکسان برای استخراج ترکیبات طبیعی به‌ویژه پلی‌فنول‌ها از جلبک‌های مشکل و گاهی غیرممکن است (Lashkan *et al*., 2012). در مطالعه حاضر در جلبک *S. cristaefolium* بالاترین میزان عصاره اولیه با استفاده از حلال متانول ۷۰ درصد (۵/۵۰ گرم) به‌دست آمد درحالی‌که در *N. zanardinii* بیش‌ترین مقدار عصاره در حلال متانول ۱۰۰ درصد (۶/۴۳ گرم) وجود داشت. همچنین در هر دو جلبک، حلال متاتول، کارایی بهتری در استخراج عصاره نسبت به اتیل استات و آب داشت. در مقایسه دو جلبک، میزان عصاره در جلبک *N. zanardinii* نسبت به *S. cristaefolium* در اکثر تیمارها بالاتر بود. در پژوهشی مشابه El-Sheekh و همکاران (۲۰۲۳) تأثیر نوع حلال (اتانول، متاتول، آب سرد، آب گرم، هگزان، دی‌اتیل‌اتر) بر میزان استخراج عصاره از گونه‌های مختلف جلبک‌های دریایی (۱۵ گونه) جمع‌آوری شده از سواحل مصر را بررسی و گزارش نمودند که میزان استخراج عصاره با توجه به نوع حلال و گونه جلبکی متفاوت در اکثر گونه‌ها بالاترین میزان عصاره در عصاره‌های آبی و متانولی بوده است. نتایج این پژوهش نشان افزایش قطبیت حلال، بازده استخراج را بهبود می‌بخشد. بالاتر بودن میزان عصاره در حلال متانولی نسبت به اتیل استات و آب، در مطالعه حاضر می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که اغلب ترکیبات محلول موجود در جلبک‌ها دارای قطبیت بالا بوده است (Taheri, 2016). در پژوهشی دیگر Thanigaivel و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که اتانول در مقایسه با سایر حلال‌ها از قبیل پترولئوم اتر، دی‌کلرومتان، کلروفرم و آب، گزینه بهتری برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از جلبک قهوه‌ای *Sargassum longifolium* و جلبک قرمز *Gracilaria folifera* است. تفاوت در میزان بازده استخراج در بین گونه‌های مختلف جلبک‌ها ممکن است به دلیل متفاوت بودن قطبیت ترکیبات موجود در جلبک‌ها و تفاوت‌های بین گونه‌ای باشد (Afrin *et al*., 2023).

پلی‌فنول‌ها گروهی از ترکیبات آلی تشکیل شده از حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های هیدروکسیل هستند. ساختار طبیعی این ترکیبات می‌تواند از مولکول‌های ساده‌ای مانند اسید فنولیک تا ترکیبات پیچیده‌ای مانند تانین‌ها متغیر باشد (Sadeghi *et al*., 2024). ترکیبات فنولی شامل فلاونوئیدها، ترپنوئیدهای فنولیک، فلوروتانین‌ها و آمینواسیدهای شبه-میکوسکپورین در ماکروجلبک‌ها و سایر منابع مانند اسفنج‌ها، مرجان‌ها، میوه‌ها، سبزیجات و گیاهان دارویی فراوان هستند. ترکیبات فنولی در منابع دریایی ساختار متنوعی دارند و از اسیدهای فنولی ساده تا ترکیبات پیچیده فلوروتانین‌ها متغیر است. فلوروتانین‌ها متابولیت‌های پلی‌فنولی ثانویه‌ای هستند که تنها در جلبک‌های قهوه‌ای یافت می‌شوند (Subbiah *et al*., 2022). میزان این ترکیبات در جلبک‌های قهوه‌ای ۲۰-۰/۵ درصد با توجه گونه جلبک و شرایط محیطی متفاوت است. تحت شرایط استرس در محیط زیست، تولید پلی‌فنول‌ها در جلبک‌های قهوه‌ای افزایش یافته و ساختارهای پیچیده‌تری تشکیل می‌شود (Cotas *et al*., 2020). در مطالعه حاضر، میزان فنول کل (فلوروتانین) در عصاره اولیه دو گونه مورد بررسی (*N. zanardinii* و *S. cristaefolium*) با توجه به نوع گونه و نوع و نسبت حلال به‌شدت متغیر و در بازه ۱۲/۴۶- ۱/۴۱ میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره بود. در مقایسه دو گونه و نوع حلال نیز، در کل میزان بالاتری از فلوروتانین در جلبک *N. zanardinii* نسبت به *S. cristaefolium* و حلال اتیل استات و متانول خالص (۱۰۰ درصد) نسبت به ترکیب آنها با آب یا آب به‌تنهایی مشاهده گردید. در هر دو جلبک کمترین میزان ترکیبات فنولی در عصاره آبی ۱۰۰ درصد وجود داشت. نتایج این پژوهش قابل مقایسه با پژوهش Sasadara و Wirawn (۲۰۲۱) است که میزان ترکیبات فنولی در عصاره خام استخراجی از جلبک *Gracilaria* sp. با استفاده از حلال‌های آب، متانول

(۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد)، اتانول (۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد) و استون (۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد) را در محدوده ۳۶/۲۷۳-۴/۷۲۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش و نشان دادند که کارایی حلال‌های آلی به شکل خالص در استخراج ترکیبات فنولی بالاتر از حلال در ترکیب با آب یا آب خالص بوده است. Chan و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که آب به عنوان یک حلال کارایی کمتری در استخراج ترکیبات فنولی از جلبک *Gracilaria changii* در مقایسه با حلال‌های آلی از قبیل اتیل‌استات و متانول داشته است. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که فلوروتانین‌ها بخش اعظمی از ترکیبات فنولی موجود در جلبک‌های قهوه‌ای را تشکیل می‌دهند (Sadeghi *et al.*, 2024). از این‌رو، به‌نظر می‌رسد که دلیل کارایی بالاتر حلال‌های آلی (اتیل استات یا متانول خالص)، قابلیت بالای حل شدن فلوروتانین‌ها در این حلال در مقایسه با سایر حلال‌ها از قبیل آب باشد (Maqsood *et al.*, 2013). در ادامه پژوهش، خالص‌سازی بیشتر عصاره متانولی اولیه حاصل از جلبک *N. zanardinii* با حلال‌های کلروفرم، دی‌کلرومتان و اتیل‌استات نشان داد که بالاترین میزان استحصال فراکشن (۲/۵۴ گرم در ۱۰۰ گرم عصاره اولیه) و فلوروتانین (۱۹/۱۴ میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره) در فراکشن اتیل استاتی وجود داشته است. این نتایج در تطابق با Kwon و همکاران (۲۰۱۳) است که نشان دادند که میزان فنول کل در فراکشن اتیل‌استاتی عصاره متانولی استخراجی از جلبک *Eisenia bicyclisand* به طور معنی‌داری نسبت به سایر فراکشن‌ها (بوتانول، هگزان، کلروفرم و آب)، بالاتر بوده است. Chakraborty و همکاران (۲۰۱۵) نیز در تلاش خود برای خالص‌سازی ترکیبات فنولی عصاره متانولی جلبک‌های *Hypnea musciformis*، *H. valentiae* و *Jania rubens* نشان دادند که در بالاترین میزان تجمع فنول‌ها در فراکشن اتیل‌استاتی در مقایسه با فراکشن‌های اِن-هگزانی و دی‌کلرومتانی بوده است. در مقایسه فراکشن‌های مختلف در مطالعه حاضر، پایین‌ترین میران فلورتانین (۱/۳۵ میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره) در فراکشن کلروفرمی وجود داشت. عموماً طی فرایند خالص‌سازی فلورتانین در گیاهان دریایی از کلروفرم یا ان-هگزان برای حذف رنگدانه‌ها و لیپیدها استفاده می‌گردد (Liu, 2015). بنابراین، پایین بودن میزان ترکیبات فنولی در این فراکشن، می‌تواند بیانگر وجود ترکیبات غیر قطبی از قبیل ترکیبات چربی دوست و رنگدانه‌ها باشد (Sadeghi *et al.*, 2024).

مطالعات پیشین نشان داده است که شاخص‌های متعددی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر دارد و استفاده از یک مدل آنتی‌اکسیدانی به‌تنهایی نمی‌تواند به طور کامل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تمامی نمونه‌ها را منعکس نماید (Afrin *et al.*, 2023). بنابراین، مدل‌های آنتی‌اکسیدانی متعدد با مکانیسم‌های مختلف برای سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد شده است. در مطالعه حاضر، برای سنجش بهتر خواص آنتی‌اکسیدانی از دو روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و کلاته‌کنندگی یون مس (کوپریک) استفاده گردید. سنجش میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به عنوان یکی از رادیکال‌های پایدار، یکی از پرکاربردترین روش‌های بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد در ترکیبات احیاءکننده (پلی‌فنول‌ها) در جلبک‌هاست (Asaduzzaman *et al.*, 2020). نتایج میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در میان عصاره‌های اولیه مختلف به‌دست آمده از دو جلبک (*N. zanardinii* و *S. cristaefolium*) نشان داد که عصاره‌های استحصالی از حلال‌های آلی به شکل خالص کارایی بهتری در مقایسه با حلال در ترکیب با آب یا آب به‌تنهایی داشته است. در هر جلبک توانایی مهار رادیکال آزاد به صورت آب ۱۰۰ درصد < اتیل‌استات ۳۰ درصد < متانول ۳۰ درصد < متانول ۷۰ درصد < اتیل‌استات ۷۰ درصد < متانول ۱۰۰ درصد < اتیل‌استات ۱۰۰ درصد به‌دست آمد. در مقایسه دو جلبک نیز *N. zanardinii* توانایی بهتری در مهار رادیکال آزاد داشت. در پژوهشی مشابه، Afrin و همکاران (۲۰۲۳) توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های خام استونی، متانولی و اتانولی شش گونه مختلف جلبک قهوه‌ای را بررسی و گزارش نمودند که بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد در عصاره متانولی نسبت به دو حلال دیگر وجود داشته است. در پژوهشی دیگر Subuj و همکاران

(۲۰۲۱) نیز گزارش نمودند که میزان مهار رادیکال آزاد عصاره خام متانولی جلبک قهوه‌ای *Padina tetrastromatica* نسبت به عصاره متاتولی بالاتر بوده است. در مقایسه فراکشن‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *N. zanardinii* نیز بالاترین مهار رادیکال، مشابه با میزان فنول فراکشن‌ها، در فراکشن اتیل‌استاتی وجود داشت. بالا بودن میزان مهار رادیکال آزاد عصاره متانولی احتمالاً به دلیل ویژگی به اشتراک گذاری یون هیدروژن این عصاره و توانایی آن در متوقف کردن فرایند اکسیداسیون از مسیر تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیبات پایدار است (Afrin *et al*., 2023). در ادامه پژوهش حاضر، نتایج خالص‌سازی عصاره متانولی با حلال‌های کلروفرم، دی‌کلرومتان و اتیل‌استات نشان داد که مشابه میزان فنول، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در فراکشن اتیل‌استاتی (۹۸/۹۵ درصد) به طور معنی‌داری نسبت به سایر فراکشن‌ها (۵۲/۵۲-۵/۹۸ درصد) و عصاره اولیه (۷۳/۲۷ درصد) بالاتر بوده است. در تحقیقی مشابه، Taheri (۲۰۱۶) در خالص‌سازی عصاره متانولی با استفاده از حلال‌های اِن-هگزان، دی‌کلرومتان و اتیل‌استاتی نیز میزان بالاتری از مهار رادیکال آزاد در فراکشن اتیل‌استاتی نسبت به سایر فراکشن‌ها را گزارش نمود. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که اتیل استات توانایی بهتری در جداسازی ترکیبات فنولی به‌ویژه فلوروتانین‌ها از عصاره اولیه در مقایسه به سایر حلال‌ها دارد (Sadeghi *et al*., 2024). در مطالعه حاضر، فراکشن اتیل‌استاتی دارای میزان بالاتری از فلوروتانین در مقایسه با سایر فراکشن‌ها نیز بود (نمودار ۵). از این‌رو، به‌نظر می‌رسد که بالاتر بودن میزان مهار رادیکال آزاد در این فراکشن به دلیل تجمع پلی‌فنول‌ها در آن بوده است. Chakraborty و همکاران (۲۰۱۵) نیز ارتباط مشابهی بین میزان بالای پلی‌فنول‌ها و خواص آنتی‌اکسیدانی در فراکشن‌های اتیل استاتی عصاره‌های اولیه متانولی به‌دست آمده از گونه‌های مختلف جلبک‌های دریایی را گزارش نمودند. پلی‌فنول‌های دریایی دارای گروه‌های هیدورکسیل هستند که با اتصالی ضعیف به حلقه‌های آروماتیک فنول متصل هستند. از این‌رو، به‌راحتی می‌توانند یک اتم هیدروژن یا الکترون را برای غیرفعال سازی رادیکال‌های آزاد به اشتراک بگذارند (Liu, 2015). مشابه سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH، سنجش کلاته‌کنندگی یون مس (کوپریک) نیز یکی از روش‌های مفید برای سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی است و به عنوان یکی از روش‌های مبتنی بر انتقال الکترون طبقه‌بندی می‌گردد. مزایایی از قبیل عدم واکنش با قندهای احیاءکننده بدون خواص آنتی‌اکسیدانی و نزدیک بودن pH محیط واکنش آن به pH فیزیولوژیک هنگام استفاده از این روش برای سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک‌های دریایی ذکر شده است (Yalçın *et al*., 2020). در مطالعه حاضر، مقایسه فراکشن‌های مختلف حاصل از عصاره متانولی جلبک *N. zanardinii* نشان داد که کلاته‌کنندگی یون مس فراکشن اتیل‌استاتی (۷۳/۴۴ درصد) به طور معنی‌داری نسبت به سایر فراکشن‌ها بالاتر بوده است. این نتایج با پژوهش Emu و همکاران (۲۰۲۳) قابل مقایسه است که نشان دادند، توانایی کلاته‌کنندگی یون مس در عصاره‌های متانولی، اتانولی و استونی گونه‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای جمع‌آوری شده از سواحل بنگلادش متأثر از نوع حلال، گونه و میزان فنول موجود در عصاره بوده است. از آن‌جایی که فراکشن اتیل‌استاتی جلبک *N. zanardinii* دارای میزان فلوروتانین بالایی بود، احتمالاً توانایی بالاتر کلاته‌کنندگی به دلیل تغلیظ پلی‌فنول‌ها در این فراکشن بوده است. ارتباط مستقیم بین میزان پلی‌فنول‌ها و خواص آنتی‌اکسیدانی در مطالعات گذشته محققین مختلف نیز گزارش شده است (Cotas *et al*., 2020; Afrin *et al*., 2023).

آلژینات یکی از پلی‌ساکاریدهای فراوان در دیواره سلولی جلبک‌های قهوه‌ای است. با این‌حال، میزان آلژینات استحصالی و خواص فیزیکی و شیمیایی آن، با توجه به نوع گونه جلبک، شرایط زیست آن و شیوه استخراج متفاوت است (Rostami *et al*., 2017). مرسوم‌ترین شیوه برای استخراج این پلی‌ساکارید، در مرحله اول استفاده از حلال‌های آلی برای حذف ترکیباتی از قبیل رنگدانه و پلی‌فنول‌ها و در ادامه استفاده از آب برای استخراج است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان

استحصال آلژینات از جلبک *Nizimudiana zanardinii* برابر با ۴/۷۳ گرم به ازاء هر ۱۰۰ گرم جلبک بوده است. Gharekhan و همکاران (۲۰۲۰) مقدار استخراج آلژینات از ۸۰ گرم جلبک قهوه‌ای *Sargassum boveanum* را ۱/۵ گرم ذکر کردند که نسبت به مطالعه حاضر بسیار کمتر است. آنها همچنین میزان توانایی آلژینات در بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH در محدوه غلظت‌های ۵۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر را به‌ترتیب ۱۰/۲۵ و ۱۷/۵۸ گزارش نمودند که تفاوت اندکی با مطالعه حاضر (۲۳/۰۷ درصد)، دارد. تفاوت در دو مطالعه احتمالاً به دلیل متفاوت بودن گونه و شرایط آزمایش است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آلژینات توانایی مناسبی در مهار یون مس دارد. این ویژگی احتمالاً به دلیل قابلیت بالای آلژینات در تشکیل ژل و متعاقباً گرانروی محلول و به دام انداختن یون‌های بوده است (Jayakody *et al.*, 2020).

نتایج این تحقیق نشان داد که نوع حلال (متانول و اتیل استات) و نسبت ترکیب آن (۷۰، ۳۰ و صفر درصد) با آب تأثیر زیادی بر میزان استخراج عصاره، فلوروتانین و خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های مورد بررسی (*S. cristaefolium* و *N. zanardinii*) دارد. در هر دو جلبک حلال‌های آلی در شکل خالص کارایی بهتری نسبت به شکل ترکیب با آب داشتند. نتایج مقایسه دو جلبک نیز نشان داد که جلبک *N. zanardinii* نسبت به *S. cristaefolium* دارای میزان فلوروتانین و خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری است. از این‌رو، از جلبک *N. zanardinii* و عصاره حاصل از حلال متانول ۱۰۰٪ برای استخراج فلوروتانین و در ادامه آلژینات استفاده گردید. نتایج ادامه پژوهش نشان داد که در فراکشن‌های مختلف حاصله شده از عصاره اولیه جلبک *N. zanardinii*، فراکشن اتیل استاتی دارای میزان فلوروتانین، مهار رادیکال آزاد و کلاته‌کنندگی یون مس بالاتری نسبت به سایر فراکشن‌ها بوده است. همچنین آلژینات استخراجی از این جلبک با استفاده از آب مقطر توانایی مناسبی در کلاته کردن یون مس داشت. به طور کلی، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نوع حلال تأثیر شگرفی بر میزان استخراج ترکیبات فنولی از جلبک قهوه‌ای دارد و میزان این ترکیبات با توجه به نوع گونه و شرایط استخراج متفاوت است.

تشکر و قدردانی

از تمامی کارشناسان آزمایشگاه مرکزی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار و پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

Afrin, F., Ahsan, T., Mondal, M.N., Rasul, M.G., Afrin, M., Silva, A.A., Yuan, C. and Shah, A.K.M.A., 2023. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of some selected seaweeds from Saint Martin's Island of Bangladesh. *Food Chemistry Advances*, 3:100393. DOI:10.1016/j.focha.2023.100393.

Asaduzzaman, A.K.M., Hasan, I., Rahman, M.H. and Tareq, A.R.M., 2020. Antioxidant and antiproliferative activity of phytoconstituents identified from *Sargassum binderi* seaweed extracts cultivated in Bangladesh. *International Journal of Biosciences*, 16(3):481-494. DOI:10.12692/ijb/16.3.481-494

Bojorges, H., Lopez-Rubio, A., Martinez-Abad, A. and Fabra, M.J., 2023. Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 140:104142. DOI:10.1016/j.tifs.2023.104142

Chakraborty, K., Joseph, D. and Praveen, N.K., 2015. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4):1924-1935. DOI:10.1007/s13197-013-1189-2

Chan, P.T., Matanjun, P., Yasir, S.M. and Tan, T.S., 2015. Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. *Journal of Applied Phycology*, 27:2377-2386. DOI:10.1007/s10811-014-0493-1

Cmikova, N., Galovicova, L., Miskeje, M., Borotova, P., Kluz, M. and Kacaniova, M., 2022. Determination of antioxidant, antimicrobial activity, heavy metals and elements content of seaweed extracts. *Plants*, 11(11):1493. DOI:10.3390/plants11111493

Cotas, J., Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A. and Gonçalves, A.M., 2020. Seaweed phenolics: from extraction to applications, *Marine Drugs*, 18:384, DOI:10.3390/md18080384.

Eghbal, H., Jahani, N., Mohammadnejad-Khiavi, N., Ahmadi-Sabegh, M. and Ghazi-Tabatabaei, Z., 2020. Investigating the importance and role of Seaweeds in industry and their pharmaceutical and environmental applications. *The Application of Chemistry in Environment*, 40:9-17. (In Persian)

El-Sheekh, M.M., Bases, E., El Shafay, S.M. and El-shenody, R., 2023. Influence of Seasonal Variations on Extract Yield and Antioxidant Activities of Some Seaweed Species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 93:915–923. DOI:10.1007/s40011-023-01493-0

Emu, S.A., Dual, M.A., Kali, T.D., Ghadni, M.S., Rasul, M.G., Mondal, M.N., Ahsan, M.E., Khan, M. and Shah, A.K.M.A., 2023. Effects of extracting solvents on phytochemical, antioxidant, and antibacterial activity of some seaweeds from the Bay of Bengal offshore Island. *Food and Humanity*, 1:1157–1166. DOI:10.1016/j.foohum.2023.09.005

Gall, E.A., Lelchat, F., Hupel, M., Jegou, C. and Stiger-Pouvreau, V., 2015. Extraction and Purification of Phlorotannins from Brown Algae. Methods in Molecular Biology, 1308:131-143. DOI:10.1007/978-1-4939-2684-8_7

Gharekhan, T.R., Kordjazi, M., Nasrollahi, S.A., Shabanpour, B. and Adeli, A., 2020. Investigation of antioxidant properties and antibacterial activity of alginate and fucoidan extracted from *Sargassum boveanum* algae collected from the Persian Gulf coast. *Aquaculture Sciences*, 7(2), 64-76. (In Persian)

Jayakody, M.M., Vanniarachchy, M.P.G. and Wijesekara, I., 2020. Seaweed derived alginate, agar, and carrageenan based edible coatings and films for the food industry: a review. *Food Measure*,

16:1195–1227. DOI:10.1007/s11694-021-01277-y

Kwon, T.H., Kim, T.W., Kim, C.G. and Park, N.H., 2013. Antioxidant activity of various solvent fractions from edible brown algae, *Eisenia bicyclisand* and its active compounds. *Journal of Food Science*, 78(5):C679–C684. DOI:10.1111/1750-3841.12109

Lashkan, A.B., Rezaei, M., Rezaei, K. and Seifabadi, S.J., 2012. Optimization of extraction of antioxidant compounds in microwave-assisted extracts of brown algae *Sargassum angustifolium*. *Journal of Fisheries*, 65(3):243-255. (In Persian)

Liu, X., 2015. Extraction and antioxidant activity of phlorotannins from edible brown algae. MSc. thesis, North Carolina State University, USA. 127 P.

Maqsood, S., Benjakul, S. and Shahidi, F., 2013. Emerging role of phenolic compounds as natural food additives in fish and fish products. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 53:162-79.

Milledge, J.J., Nielsen, B.V. and Bailey, D., 2015. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. DOI:10.1007/s11157-015-9381-7

Rostami, Z., Tabarsa, M., You, S. and Rezaei M., 2017. Relationship between molecular weights and biological properties of alginates extracted under different methods from *Colpomenia peregrina*. *Process Biochemistry*, 58:289-297. DOI:10.1016/j.procbio.2017.04.037

Sadeghi, A., Rajabiyan, A., Nabizade, N., Meygoli Nezhad, N. and Zarei-Ahmady, A., 2024. Seaweed-derived phenolic compounds as diverse bioactive molecules: A review on identification, application, extraction and purification strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 266:131147. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.131147

Sasadara, M.M.V. and Wirawan, I.G.P., 2021. Effect of extraction solvent on total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Bulung Sangu* (*Gracilaria* sp.) Seaweed. 3rd international conference on bioscience and biotechnology, IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*, 712:012005. DOI:10.1088/1755-1315/712/1/012005

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 Agriculture and Food Chemistry*, 40:945-948. DOI:10.1021/jf00018a005

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152-178. DOI:10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Sobuj, M.K.A., Islam, M., Mahmud, Y. and Rafiquzzaman, S.M., 2021. Effect of solvents on bioactive compounds and

antioxidant activity of *Padina tetrastromatica* and *Gracilaria tenuistipitata* seaweeds collected from Bangladesh. *Scientific Reports*, 11(1):1-13. DOI:10.21203/rs.3.rs-557313/v1

Subbiah, V., Xie, C., Dunshea, F.R., Barrow, C.J. and Suleria, H.A.R., 2022. The quest for phenolic compounds from seaweed: nutrition, biological activities and applications. *Food Reviews International*, 39(2):1-28. DOI:10.1080/87559129.2022.2094406

Taheri, A., 2016. Antioxidant activity in some Iranian seaweed species from Chabahar. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2):802-817. DOI:20.1001.1.15622916.2016.15.2.14.0

Thanigaivel, S., Vidhya Hindu, S., Vijayakumar, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. and Thomas, J., 2015. Differential solvent extraction of two seaweeds and their efficacy in controlling *Aeromonas salmonicida* infection in *Oreochromis mossambicus*: A novel therapeutic approach. *Aquaculture*, 443:56–64. DOI:10.1016/j.aquaculture.2015.03

Wong, S.P., Leong, L.P. and William Koh, J.H., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4):775-783.

Yalçın, S., Uzun, M., Karakaş, Ö., Sözgen Başkan, K., Okudan, E. Ş. and Apak, M.R., 2020. Determination of total antioxidant capacities of algal pigments in seaweed by the combination of high-performance liquid chromatography (HPLC) with a cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay. *Analytical Letters*, 54(14):2239-2258. DOI:10.1080/00032719.2020.1855439