ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا آمیلاز دو گونه *Sargassum angustifolium* و *Palisada perforata*

کیانا پیریان[۱]، سهیلا معین[۲*]، جلوه سهرابی‌پور[۳]، رضا ربیعی[۳] و خسرو پیری[۱]

[۱] همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی گیاهی

[۲] بندرعباس، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

[۳] بندرعباس، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، بخش گیاه پزشکی

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۵

چکیده

بیماری دیابت نوع دو، ناشی از اختلال در عملکرد و ترشح انسولین و به دنبال آن افزایش میزان قند خون است که به سومین عامل مرگ و میر در جهان تبدیل شده‌است. مشتقات فعال اکسیژن از جمله عوامل آسیب و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و دیابت می‌باشند. اثرات جانبی مخرب مصرف داروهای سنتزی بر بیماران، تحقیقات را به سمت داروهای طبیعی متمایل کرده‌است. در این تحقیق، فعالیت آنتی‌دیابتی و آنتی‌اکسیدانی سه عصاره متانولی، اتیل‌استاتی و انهگزانی دو گونه ماکروجلبک *Palisada perforata* و *Sargassum angustifolium* بررسی شده‌است. نمونه‌های جلبک پس از جمع‌آوری از سواحل خلیج‌فارس و آماده‌سازی، به روش پرکولاسیون عصاره‌گیری شدند. فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز غلظتهای مختلف نمونه‌ها بر اساس روش DNSA و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها نیز براساس دو روش تخریب رادیکال آزاد $ABTS^+$ و احیاکنندگی FRAP بررسی شد. عصاره اتیل‌استات *S. angustifolium* و *P. perforata* به ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفا آمیلاز را نشان دادند ($P<0.05$). همچنین بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پاکسازی $ABTS^+$ و احیاکنندگی FRAP به ترتیب در نمونه‌های اتیل‌استات *S. angustifolium* و *P. perforata* مشاهده شد ($P<0.05$). به طورکلی عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی در هر دو گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نسبت به عصاره غیرقطبی آن گونه نشان دادند و گونه *S. angustifolium* بالاترین فعالیت را برای هر دو سنجش مهار آنزیم آلفاآمیلاز و تخریب رادیکال آزاد $ABTS^+$ نشان داد. دو گونه جلبک خوراکی مورد تحقیق با نشان دادن فعالیت قابل توجه آنتی‌دیابتی و آنتی‌اکسیدانی، با تحقیقات تکمیلی دارای پتانسیل کاربرد مستقیم در رژیم غذایی و همچنین استفاده در صنایع پزشکی و داروسازی می‌باشند.

واژه های کلیدی: ماکروجلبک، خلیج فارس، آنزیم آلفا آمیلاز، *Sargassum angustifolium*، *Palisada perforata*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۱۱۲۷۵۳۹ ، پست الکترونیکی: Soheila_9@yahoo.com

مقدمه

امروزه بیماریهایی همچون دیابت و نارساییهای قلبی و عروقی که از عوامل ناتوانی و مرگ زودرس افراد می‌باشند به دلیل تغییرات در الگوهای غذایی و رفتاری افراد از قبیل تمایل به رژیمهای غذایی پرکالری و غنی از اسیدهای چرب اشباع، کم تحرکی و کاهش فعالیت بدنی، به طور قابل توجهی در سرتاسر جهان در حال افزایش هستند (۳۷). بیماری دیابت نقص متابولیکی است که در اثر اختلال در عملکرد و ترشح انسولین و به دنبال آن افزایش قند خون ایجاد می‌شود. این بیماری بعد از سرطان و بیماریهای قلبی و عروقی در جایگاه سومین عامل مرگ و

میر افراد قرار می‌گیرد. با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهانی بیماران دیابتی، تخمین زده‌شده‌است که تا سال ۲۰۳۰ تعداد بیماران دیابتی به ۳۶۶ میلیون نفر خواهد رسید (۳۱). دیابت نوع دو از بیماریهای رایج است که عموماً با یک دوره قبل از دیابتی (pre-diabetes) شروع می‌شود، به طوری که در این دوره میزان قند خون قبل از مصرف مواد غذایی تنها کمی بیشتر از حد نرمال است و حذف کامل گلوکز مصرفی از خون به خوبی انجام نمی-شود (۳۵). افزایش بیش از حد گلوکز مصرفی در خون سبب تسریع در روند بیماری دیابت و به دنبال آن نارساییهای قلبی عروقی، کلیوی و ناتوانیهای عصبی می‌گردد که همگی از عوارض طولانی مدت بیماری دیابت هستند (۷). بیماری دیابت از طریق تزریق انسولین یا مصرف خوراکی داروهای ضد دیابت از قبیل sulfonylureas و biguanide قابل درمان است اما متاسفانه مصرف طولانی مدت داروهای سنتزی جهت درمان بیماری دیابت اثرات جانبی سوئی بر بیماران به جای می‌گذارد (۴۰). مشتقات فعال اکسیژن (reactive oxygen species) و رادیکالهای آزاد از جمله عوامل آسیب و مرگ برنامه ریزی شده سلولی، بیماریهای قلبی-عروقی، سرطان، دیابت وغیره می‌باشد (۴۷). استرسهای اکسیداتیو با القای برخی از فرآیندهای سلولی از جمله عوامل تشدید کننده یا شروع کننده بیماری دیابت به شمار می‌آیند. مطالعات نشان داده-اند، بالا بودن دائمی و مزمن قند خون در بیماران دیابتی سبب افزایش سطح استرس اکسیداتیو و در نتیجه اختلال در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی طبیعی بدن و تجمع و افزایش رادیکالهای آزاد در بدن خواهد شد (۲۵). مشتقات فعال اکسیژن ترشح شده از میتوکندری منبع ایجاد استرس اکسیداتیو و متعاقباً سبب شروع دیابت نوع یک از طریق آپوپتوزیس سلولهای بتا پانکراس و شروع دیابت نوع دو از طریق مقاومت به انسولین خواهند شد (۲۲). آنتی‌اکسیدانها به دو دسته آنتی‌اکسیدانهای شیمیایی و طبیعی تقسیم می-شوند که در این میان آنتی‌اکسیدانهای شیمیایی مانند هیدروکسی انیزول بوتیلید(BHA)، هیدروکسی تولوئن بوتیلتید (BHT) و پروپیل گالات (PG)و غیره با وجود کاربرد فراوان در صنایع دارویی و غذایی اما متاسفانه اثرات جانبی مضری مانند سرطان از آنها گزارش شده‌است (۴۲). بنابراین با توجه به اثرات جانبی مضری که مصرف طولانی مدت داروهای سنتزی ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی بر بیماران به جای می‌گذارند، تحقیقات بسیاری جهت شناسایی ترکیبات طبیعی دارای خاصیت ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی در حال انجام است. با افزایش آگاهی و تمایل روزافزون افراد جهت جایگزینی داروهای سنتزی با ترکیبات طبیعی و آنتی اکسیدانها در راستای درمان بیماریها از جمله دیابت در سالهای اخیر محققین بسیاری توجه خود را به منابع با ارزش طبیعی معطوف کرده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند برخی از مواد غذایی همچون مخمر سویا (۱۰). سیب زمینی شیرین (۲۴)، چای (۴۷)، پروتئین ماهی (۲۳) و ماکروجلبکها (۱۷) که دارای این ترکیبات طبیعی هستند، دارای خاصیت ضد دیابتی می‌باشند. موادغذایی دارای خواص ضد دیابتی عموماً با مهار فعالیت دو آنزیم گلوکوزیداز و آلفاآمیلاز که آنزیمهای هیدرولیزکننده کربوهیدراتها هستند، از بالا رفتن قند خون جلوگیری می‌کنند (۳۹).

ماکروجلبکها از جمله منابع دریایی پایدار تولید کننده ترکیبات بیوشیمیایی هستند که توانایی تولید دامنه وسیعی از متابولیتهای ثانویه فعال بیولوژیکی را دارا می‌باشند. شناسایی و جداسازی بسیاری از ترکیبات فعال بیولوژیک در جلبکها اخیراً توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده‌است (۳۰). ماکروجلبکها سرشار از ترکیبات متنوعی از جمله استروئیدها، ترپنوئیدها، فلوروتانین، کارتنوئید، اسیدهای آمینه، الکانها، کتونها، ترکیبات فنلی وغیره می-باشند که جایگاه ویژه‌ای را در صنایع غذایی، بهداشتی، آرایشی و به ویژه داروسازی و پزشکی به خود اختصاص داده‌اند (۴۸). ماکروجلبکها را می‌توان براساس رنگدانه‌ای که تولید می‌کنند به سه گروه ماکروجلبکهای سبز، قرمز و

قهوه‌ای تقسیم‌بندی کرد. ماکروجلبکهای قهوه‌ای دارای ترکیبات متنوع پلی‌ساکاریدی ازجمله لامینارین، فوکوایدان و آلژینات هستند که خواص بیولوژیک متعددی را نشان داده‌اند (۳۳). مطالعات نشان داده اند فوکوزانتین موجود در ماکروجلبکهای قهوه‌ای علاوه بر ممانعت از تجمع چربی و پیشگیری از چاقی به عنوان ترکیب ضد دیابتی نیز مؤثر می‌باشد (۴۲). فوکوئیدانها، گروههای پلی‌ساکاریدی هستند که با داشتن دو زیرواحد مهم L–فوکوز و سولفات استرها دارای خواص بیولوژیکی متعددی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت، ضد التهاب می‌باشند که این ترکیبات را می-توان تنها در ماکروجلبکهای قهوه‌ای یافت (۴۳). ماکروجلبکهای قرمز با داشتن برخی ترکیبات خاص از جمله فیکوبیلی‌پروتئینها و میزان بالای ترکیبات پلی‌فنلی و پروتئینی عموماً خواص بیولوژیک مؤثری از قبیل آنتی-اکسیدانی، آنتی‌باکتریال و ضدسرطانی را نشان داده‌اند (۴۴). ترکیبات پلی‌فنلی موجود در ماکروجلبکهای قرمز نیز به عنوان یکی از ترکیبات مؤثر بر دیابت از طریق اثر بر آنزیمهای هضم کننده نشاسته شناخته شده‌اند (۲۰). سواحل خلیج‌فارس و دریای عمان در جنوب ایران دارای تنوع بالایی از گونه‌های مختلف ماکروجلبکی هستند به طوری که تاکنون ۲۵۰ گونه از آنها شناسایی شده‌اند (۳۸). با توجه به وجود ترکیبات ضد دیابتی ارزشمند در ماکروجلبکها در این تحقیق برای اولین بار خواص آنتی-اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد $ABTS^+$ و احیاکنندگی FRAP) و ضد دیابتی (مهار آنزیم آلفا آمیلاز) عصاره‌های انهگزانی، متانولی و اتیل‌استاتی دو گونه مهم ماکروجلبک قرمز (*Palisada perforate* (Bory) K. W. Nam) و قهوه ای (*Sargassum angustifolium* C. Agardh) خلیج فارس، بررسی شدند.

مواد و روشها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها: جمع‌آوری و آماده-سازی گونه‌های جلبکی: نمونه‌های جلبک از آبهای خلیج-فارس از استان هرمزگان، از مناطق جزرو مدی سواحل بندرعباس (N27°9.56'E56°14.26') و بندر لنگه (N26°33.46'E54°53.57') جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت حذف ذرات شن، اپی‌فیتها و صدفها با آب دریا شسته و در کیسه‌های پلاستیکی برچسب‌گذاری شده به آزمایشگاه منتقل و در آنجا جهت حذف دقیق نمکها و ذرات شن و ماسه با آب مقطر به خوبی شسته شدند. شیتهای هرباریومی از نمونه‌ها تهیه و پس از کد گذاری در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان نگهداری شدند. نمونه‌ها براساس صفات مرفولوژیکی و سلولی توسط کلیدهای شناسایی معتبر شناسایی شدند (۱۱). پس از خشک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، نمونه‌های خشک شده، پودر و جهت آنالیزهای بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

عصاره‌گیری: جهت تهیه عصاره‌های غیر آبی از نمونه‌ها از سه حلال هگزان، اتیل استات، متانول به ترتیب قطبیت استفاده شد. بدین منظور ۳۰ گرم از نمونه خشک و پودر شده هریک از جلبکها در حلالهای هگزان، اتیل استات، متانولی به ترتیب در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. تمامی عصاره‌های به دست‌آمده به صورت جداگانه توسط کاغذ صافی واتمن صاف و توسط دستگاه روتاری (Strike 102، ایتالیا) در شرایط خلاء تبخیر شدند. عصاره-های تغلیظ شده تا انجام آزمایشات در یخچال دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بررسی مهار آنزیم آلفاآمیلاز توسط مهارکننده آکاربوز به عنوان استاندارد: بررسی مهار آنزیم آلفاآمیلاز بر اساس روش هنساواسدی و همکاران (۱۲) با کمی تغییرات انجام شد. در این آزمایش آکاربوز که از مهارکننده‌های سنتزی قوی آنزیم آلفا آمیلاز است به عنوان مهار کننده استاندارد، نشاسته به عنوان سوبسترا و محلول رنگی DNSA (Dinitrosalicylic acid) به عنوان متوقف کننده واکنش و شناسایی کننده مالتوز آزاد شده در واکنش، در نظر گرفته

شدند. جهت انجام واکنش آنزیم آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1) با غلظت unit/mL ۱ در سدیم فسفات بافر ۰/۰۲ مولار با pH ۶/۹ تهیه گردید. جهت انجام آزمایش۲۰ میکرولیتر از هریک از غلظتهای مختلف آکاربوز ($mg\ mL^{-1}$ ۳-۲-۱-۰/۵-۰/۲۵-۰/۱) به همراه ۲۰۰میکرولیتر نشاسته ۱ درصد (w/v) و ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم آلفا آمیلاز $unit\ mL^{-1}$ ۱ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت انجام واکنش انکوبه شدند. سپس جهت توقف و اندازه‌گیری میزان مالتوز موجود در واکنش، محلول DNSA به مخلوط واکنش اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد جهت توقف کامل واکنش قرارگرفتند. پس از انکوباسیون، در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتری اندازه‌گیری شد.

بررسی مهار آنزیم آلفا آمیلاز توسط نمونه‌ها: سنجش میزان بازدارندگی آنزیم آلفا آمیلاز توسط عصاره‌ها بر اساس روش رنگ سنجی DNSA و با اندازه‌گیری میزان کاهش آزادسازی مالتوز از نشاسته انجام می‌گیرد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از غلظتهای مختلف عصاره ($mg\ mL^{-1}$ ۶ و ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵) به ۲۰۰ میکرولیتر نشاسته ۱ درصد (w/v) و ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم آلفا آمیلاز unit/mL ۱ اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون واکنش با اضافه کردن محلول DNSA به نمونه‌ها و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه درحمام آب گرم ۸۵ درجه سانتی‌گراد، متوقف شد. در نهایت پس از انکوباسیون و سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب آنها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده‌شد.

در کلیه آزمایشات یک مخلوط واکنش بدون داشتن آنزیم آلفا آمیلاز که دارای صفر درصد فعالت آنزیمی است به عنوان کنترل کننده منفی (بلانک) و یک مخلوط واکنش دیگر بدون مهارکننده که دارای صد در صد فعالیت آنزیمی است به عنوان کنترل کننده مثبت در نظر گرفته شد.

بررسی درصد مهار کنندگی نمونه‌ها: میزان مالتوز نمونه‌ها بر اساس منحنی کالیبراسیون مالتوز که بر مبنای ۰- ۷۰ درصد (V/W) است، محاسبه گردید. سپس میزان مهار براساس فرمول زیر برای هریک از نمونه‌ها و استاندارد محاسبه شد.

$$\text{درصد واکنش} = \frac{\text{میزان مالتوز در بلانک (بدون آنزیم)} - \text{میزان مالتوز در نمونه مهار کننده}}{\text{میزان مالتوز در بلانک} - \text{میزان مالتوز در نمونه بدون مهار کننده (کنترل)}} \times 100$$

درصد واکنش – ۱۰۰= درصد مهار

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد $ABTS^+$: $ABTS^+$ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) رادیکال آزادی است که با گرفتن الکترون از رنگ سبز پر رنگ به رنگ سبز کمرنگ یا بی رنگ تغییر رنگ می‌دهد. در این تحقیق ظرفیت تخریب رادیکال آزاد $ABTS^+$ در نمونه‌ها بر اساس روش آرنا و همکاران (۴) با اندکی تغییرات انجام‌شد. جهت انجام آزمایش، ابتدا دو محلول پایه ABTS (۷/۴ میلی‌مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۶ میلی‌مولار) تهیه شدند و در ادامه با مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر، محلول $ABTS^+$ تهیه گردید. به منظور تکمیل واکنش، محلول اصلی به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. پس از ۱۶ ساعت، جذب محلول تهیه شده با رقیق شدن توسط متانول۹۶ درصد به جذب ۱/۰۰ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رسانده‌شد. جهت بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها، ۰/۲ میلی‌لیتر از هریک از غلظتهای مختلف عصاره‌ها ($mg\ mL^{-1}$ ۶ و ۳، ۱/۵) به ۴ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده $ABTS^+$ اضافه و پس از نگهداری به مدت ۶ دقیقه در تاریکی، جذب نمونه‌هادر ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمایش کوئرستین به عنوان استاندارد آنتی‌اکسیدانی و مخلوط واکنش بدون مهارکننده به عنوان کنترل در نظر گرفته‌شد. ظرفیت آنتی-

اکسیدانی نمونه‌ها براساس فرمول زیر محاسبه گردید (A میزان جذب نمونه و کنترل می‌باشد).

درصد احیاکنندگی=(1−($A_{نمونه}$/$A_{کنترل}$) × ۱۰۰

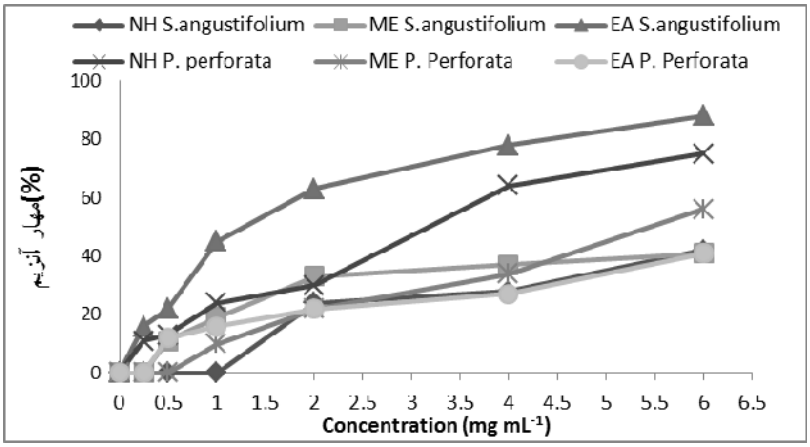
ارزیابی ظرفیت احیاکنندگی FRAP: اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن FRAP (Ferric reducing ability of plasma) غلظتهای مختلف (۱/۵ mg mL^{-1} و۳، ۶) سه عصاره متانولی، اتیل‌استاتی و ان‌هگزانی هریک از دو گونه جلبک مطالعه شده براساس روش بنزی و استرین (۵) انجام شد. در این سنجش ۰/۰۲ میلی‌لیتر عصاره به همراه ۱میلی لیتر از محلول کار FRAP تهیه شده مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. پس از گذشت ۵ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه-گیری شد. ماده استاندارد آسکوربیک اسید نیز همراه با نمونه‌ها سنجیده شد و ظرفیت احیاکنندگی FRAP نمونه‌ها براساس معادله خط به دست آمده برای ظرفیت احیاکنندگی آسکوربیک اسید به صورت میکروگرم آسکوربیک اسید بر میلی‌گرم عصاره بیان گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات در سه تکرار صورت گرفت و نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان گردیدند. IC_{50} و EC_{50} نمونه‌ها به ترتیب توسط آنالیز همبستگی خطی حاصل از مقادیر درصد مهار آنزیم آلفا آمیلاز و درصد احیاکنندگی ABTS برای غلظتهای مختلف نمونه‌ها، تعیین شد. داده‌های حاصل توسط نرم افزار SPSS بر اساس تجزیه واریانس فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرارگرفتند و مقایسه میانگینها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح معنی‌داری$P<0.05$ انجام شد.

نتایج

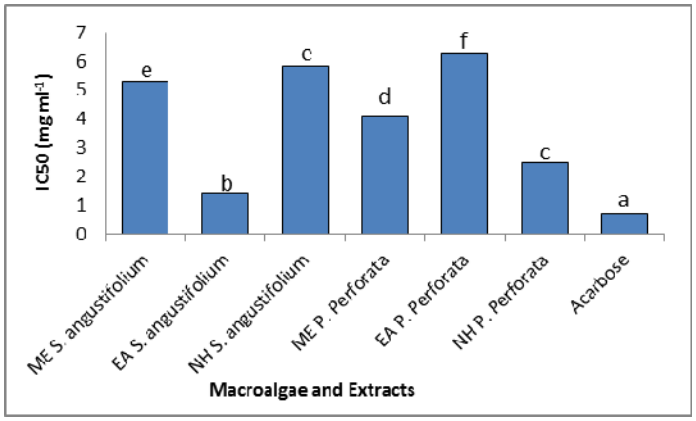
بررسی مهار آنزیم آلفا امیلاز: در این مطالعه اثر مهار کنندگی آنزیم آلفا آمیلاز توسط غلظتهای مختلف سه عصاره هگزانی، اتیل استاتی و متانولی حاصل از دو جلبک *P. perforata* (قرمز) و *S. angustifolium* (قهوه‌ای) براساس میزان تبدیل نشاسته به مالتوز بررسی شد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده‌است، با افزایش غلظت عصاره‌ها (۶ mg mL^{-1} و ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵) میزان مهار آنزیمی نیز افزایش می‌یابد. اثر مهارکنندگی عصاره‌های متانولی، اتیل استاتی و ان‌هگزانی جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium*، به ترتیب درغلظتهای کمتر از ۰/۵ mg mL^{-1}، ۰/۲۵ و ۲ متوقف گردید.



شکل۱- بررسی میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز توسط غلظتها مختلف عصاره‌های متانولی (ME)، اتیل استاتی (EA) و هگزانی (NH) دو جلبک *P. perforata* و S. *angustifolium*

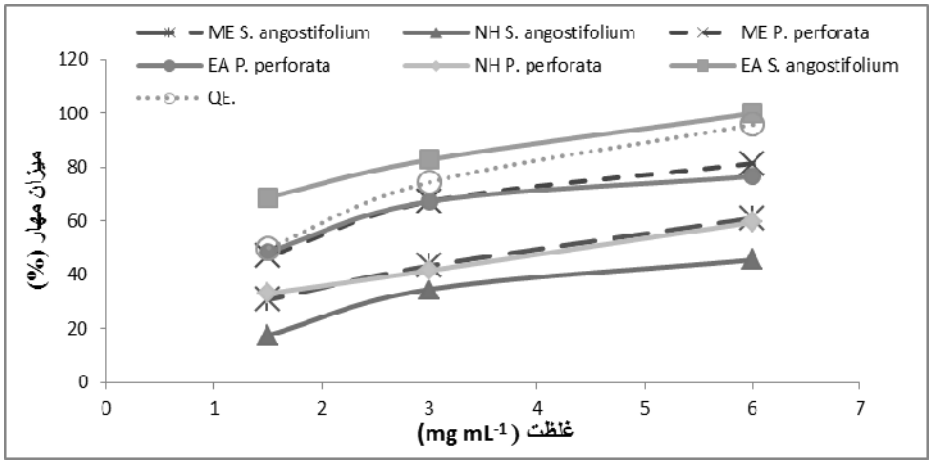
همچنین در جلبک قرمز *P . perforata* اثر مهارکنندگی درغلظتهای کمتر از ۱ mg mL^{-1}، ۰/۵ و ۰/۲۵ به ترتیب در عصاره‌های متانولی، اتیل استاتی و ان‌هگزانی مشاهده نشد. فقط عصاره اتیل استاتی *S. angustifolium* و ان‌هگزانی *P. perforata* در غلظت ۰/۲۵ mg mL^{-1} اثر مهارکنندگی نشان دادند. عصاره‌های متانولی و ان‌هگزانی *S. angustifolium* در غلظت ۶ mg mL^{-1}، اثر مهارکنندگی یکسانی (۴۰ درصد) را نشان دادند در حالی که عصاره اتیل استاتی آن در همان غلظت دو برابر قدرت مهارکنندگی (۸۸ درصد) را نشان داد. در جلبک *P. perforata* هریک از عصاره‌های متانولی، اتیل استاتی و ان‌هگزانی در غلظت ۶ mg mL^{-1} به ترتیب میزان مهارکنندگی متفاوتی در حدود ۵۵، ۲۷ و ۷۵ درصد را نشان دادند.

در شکل ۲، غلظتی از عصاره که دارای ۵۰ درصد قدرت مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز است (IC_{50}) برای هریک از عصاره‌های متانولی، اتیل استاتی و ان هگزانی دو گونه جلبک *S. angustifolium* *P. perforata* , محاسبه و با IC_{50} آکاربوز (استاندارد) مقایسه شده‌اند. به طور کلی رنج IC_{50} عصاره‌های مختلف دو گونه جلبک مورد مطالعه بین ۶/۳۳±۰/۲۲ mg mL^{-1}-۱/۴۳±۰/۳۲به دست آمد که همگی با میزان IC_{50} به دست امده برای آکاربوز ۰/۷۵±۰/۰۷ mg mL^{-1} اختلاف معنی داری را نشان دادند. در جلبک *S. angustifolium*، IC_{50} دو عصاره ان هگزانی و متانولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند درحالی که عصاره اتیل استاتی به طور معنی داری با کمترین IC_{50} (۱/۴۳±۰/۳۲mg mL^{-1})، بیشترین مهار آنزیم آلفا آمیلاز را نسبت به دو عصاره دیگر نشان داد. در جلبک *P. perforata*، سه عصاره از نظر میزان بازدارندگی آنزیم آلفا آمیلاز اختلاف معنی داری را نشان دادند به طوری که عصاره ان هگزانی با کمترین IC_{50} (۲/۵۱±۰/۲۵) بالاترین میزان بازدارندگی و عصاره اتیل استاتی با IC_{50} در حدود ۶/۳±۰/۳۱ mg mL^{-1} کمترین میزان بازدارندگی را نشان دادند. به طورکلی در بین دو گونه جلبک و عصاره‌های آنها، عصاره اتیل استاتی *S. angustifolium* با کمترین IC_{50} (۱/۴۳±۰/۳۲mg mL^{-1}) و عصاره اتیل استاتی *P. perforata* با بیشترین IC_{50} (۶/۳±۰/۳۱ mg mL^{-1}) به ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفا آمیلاز را نشان دادند.



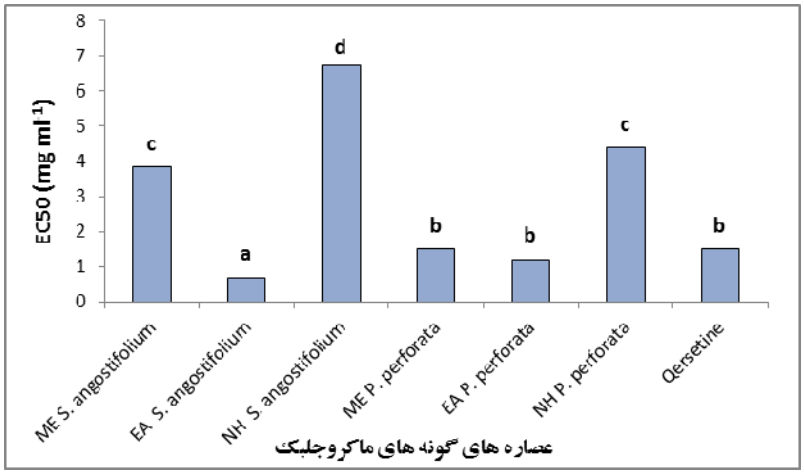
شکل۲- مقایسه میزانIC_{50} - مهار آنزیم آلفا آمیلاز توسط عصاره‌های متانولی (ME)، اتیل استاتی (EA) و ان هگزانی (NH) دو جلبک *S. angustifolium* و *P. perforata* است و آکاربوز به عنوان استاندارد استفاده شده‌است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها می‌باشد ($P<0.05$).

بررسی ظرفیت مهار رادیکال آزاد $ABTS^+$: در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظتهای مختلف ($mg\ mL^{-1}$ ۶ و ۳، ۱/۵) سه عصاره متانولی، اتیل استاتی و انهگزانی دو گونه جلبک *P. perforata* و *S. angustifolium*، نتایج نشان دادند همراه با افزایش غلظت نمونه‌ها میزان ظرفیت آنتی-اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد (شکل ۳). همان طور که در شکل ۳ نشان داده‌شده‌است، در گونه *P. perforata* دو عصاره اتیل استاتی و متانولی در هر سه غلظت فعالیت یکسانی را در مهار رادیکال آزاد نشان دادند (۸۱/۵۰ – ۳۱/۱۴) درصد و همچنین عصاره انهگزانی آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایین‌تری را نسبت به دو عصاره دیگر نشان داد ($P<0.05$). در حالی که در گونه *S. angustifolium* عصاره اتیل استاتی> متانولی > انهگزانی در هر سه غلظت به ترتیب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را نشان دادند ($P<0.05$).



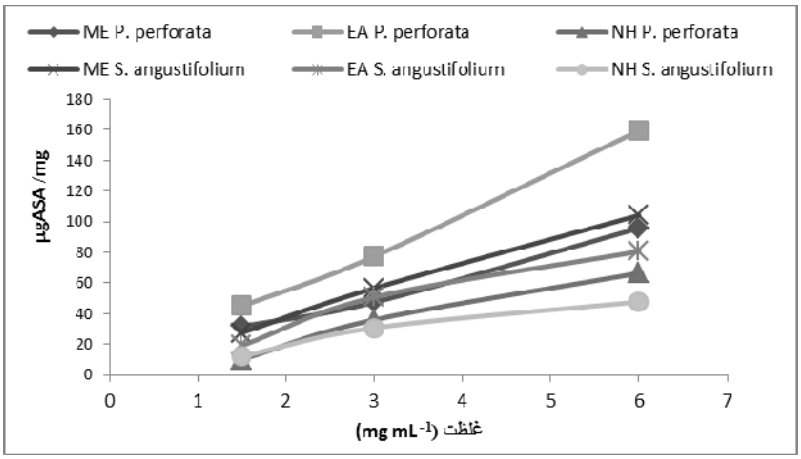
شکل ۳- بررسی میزان بازدارندگی رادیکال آزاد $ABTS^+$ توسط ماده استاندارد کوئرستین (QE) و همچنین غلظتها مختلف عصاره‌های متانولی (ME)، اتیل استاتی (EA) و هگزانی (NH) دو گونه جلبک *S. angustifolium* و *P. perforata*

در شکل ۴، غلظتی از عصاره که جهت احیاکنندگی ۵۰ درصد رادیکال آزاد $ABTS^+$ لازم است (EC_{50})، برای هریک از عصاره‌های متانولی، اتیل‌استاتی و انهگزانی دو گونه جلبک *S. angustifolium* و *P. perforata* , نشان داده شده‌است که همگی با EC_{50} کوئرستین (استاندارد) مقایسه شده‌اند. EC_{50} عصاره‌های مختلف دو گونه جلبک مورد مطالعه در محدوده $mg\ mL^{-1}$ ۴/۳۸±۰/۱۲– ۰/۷۰±۰/۰۸ قرار گرفتند. در جلبک *S. angustifolium* هر سه عصاره از نظر ظرفیت آنتی‌کسیدانی اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر و با کوئرستین نشان دادند که در این میان عصاره اتیل استاتی با کمترین $mg\ mL^{-1}$ ۰/۷۰±۰/۰۸= EC_{50} بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به دو عصاره متانولی و انهگزانی ($mg\ mL^{-1}$ ۶/۷۳±۰/۳۳ و۳/۸۴±۰/۲۳= EC_{50}) و همچنین کوئرستین ($mg\ mL^{-1}$ ۱/۵۰±۰/۱۰=EC_{50}) نشان داد ($P<0.05$). در جلبک *P. perforata* دو عصاره متانولی و اتیل‌استاتی با EC_{50} در حدود (۱/۳۰±۰/۱۵=EC_{50}) اختلاف معنی‌داری را با کوئرستین ($mg\ mL^{-1}$ ۱/۵۰±۰/۱۰= EC_{50}) نشان ندادند ($P<0.05$). به طورکلی در بین دو گونه جلبک و عصاره-های آنها، عصاره اتیل‌استاتی و انهگزانی *S. angustifolium* به ترتیب با کمترین EC_{50} ($mg\ mL^{-1}$ ۰/۷۰±۰/۰۸) بیشترین EC_{50} ($mg\ mL^{-1}$ ۶/۷۳±۰/۳۳) به ترتیب بیشترین و کمترین ظرفیت آنتی-اکسیدانی را نشان دادند. در میان نمونه‌ها تنها عصاره اتیل استاتی *S. angustifolium* ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نسبت به استاندارد کوئرستین نشان داد.



شکل ۴- مقایسه میزان EC_{50} - مهارکنندگی رادیکال آزاد $ABTS^{+}$ عصاره‌های متانولی (ME)، اتیل استاتی (EA) و ان هگزانی (NH) دو جلبک *S. angustifolium* و *P. perforata* و کوئرستین به عنوان استاندارد. حروف (a, b, c, d) متفات نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها است ($P<0.05$).

بررسی ظرفیت احیاکنندگی FRAP: همان طور که در شکل ۵ نشان داده شده‌است، در سنجش ظرفیت احیاکنندگی FRAP غلظتهای مختلف ($1/5$ mg mL^{-1} و ۳، ۶) سه عصاره متانولی، اتیل‌استاتی و ان‌هگزانی دو گونه جلبک سنجیده شده براساس استاندارد آسکوربیک اسید، همراه با افزایش غلظت نمونه‌ها سنجش احیاکنندگی آنها نیز افزایش یافته‌است. به طوری که ظرفیت احیاکنندگی کلیه نمونه‌ها در غلظت ۶ mg mL^{-1} به طور قابل توجهی بسیار بالاتر از غلظت $1/5$ mg mL^{-1} سنجیده شد. آنالیزها نشان دادند، نه تنها غلظتهای مختلف هر نمونه ظرفیت احیاکنندگی متفاوتی را نشان دادند بلکه ظرفیت احیاکنندگی هر یک از نمونه‌ها در عصاره‌های مختلف آن نیز تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($P<0.05$).



شکل ۵- بررسی میزان ظرفیت احیاکنندگی FRAP توسط غلظتهای مختلف سه عصاره متانولی (ME)، اتیل استاتی (EA) و هگزانی (NH) دو گونه جلبک *S. angustifolium* و *P. perforata*

در جدول ۱ ظرفیت احیاکنندگی FRAP نمونه‌ها براساس میکروگرم آسکوربیک اسید بر میلی‌گرم عصاره خشک (µg ASA/ mg) جهت مقایسه بهتر نمونه‌ها آمده‌است. عصاره اتیل استاتی گونه *P. perforata* با نشان دادن

ظرفیت احیاکنندگی ۳۲/۵۳ µg ASA/mg به طور معنی-داری بالاترین ظرفیت احیاکنندگی و عصاره انهگزانی هر دو گونه *P. perforata* (۷/۲۰µg ASA/mg) و *S. angustifolium* (۸/۷۲ µg ASA/mg) پایین‌ترین ظرفیت احیاکنندگی را در میان کلیه نمونه‌ها نشان دادند (P<0.05).

ظرفیت احیاکنندگی سه عصاره بررسی شده در گونه *S. angustifolium* به ترتیب افزایش به صورت متانول> اتیل‌استات > انهگزان و در گونه *P. perforata* به صورت اتیل‌استات> متانول > انهگزان،سنجیده شد (P<0.05).

جدول۱- مقایسه ظرفیت احیاکنندگی FRAP عصاره‌های متانولی، اتیل استاتی و ان هگزانی دو گونه جلبک *S. angustifolium* و *P. perforata* براساس میکروگرم آسکوربیک اسید بر میلی‌گرم عصاره (µg ASA/ mg).

گونه	عصاره		
	متانول	اتیل استات	انهگزان
S. angustifolium	۲۰/۵۳ [b]	۱۴/۵۴ [c]	۸/۷۲[d]
P. perforata	۲۱/۱۷[b]	۳۲/۵۳ [a]	۷/۲۰[d]

[a, b, c, d] حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها است (P<0.05).

بحث

در بیماران دیابتی نوع ۲ کنترل سطح گلوکز در پلاسما بعد از صرف غذا از اولین و مهمترین مراحل درمانی می‌باشد که بدین منظور یکی از راههای درمانی، ممانعت از عملکرد آنزیمهای دخیل در متابولیسم کربوهیدراتها جهت جلوگیری از افزایش گلوکز ناشی از غذا می‌باشد (۱۷). آلفا آمیلاز از جمله آنزیمهای کلیدی در هضم کربوهیدراتها می‌باشد که هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی 1,4-D-α موجود در ترکیبات نشاسته‌ای (آمیلوز و آمیلوپکتین)، گلیکوژن و الیگوساکاریدهای مختلف را کاتالیز می‌کند و با تولید الیگوساکاریدهای کوتاه، مالتوز وگلوکز سبب افزایش سطح گلوکز خون می‌شوند (۳۷). بازدارنده‌های آلفا آمیلاز با ممانعت از عملکرد آلفاآمیلاز سبب کاهش جذب گلوکز از روده و متعاقباً مانع از افزایش سریع سطح گلوکز خون می‌شوند. در این مطالعه اثر سه عصاره متانولی، اتیل استاتی و ان هگزانی دو جلبک *S. angustifolium* و *P. perforata* سنجیده شد. نتایج نشان دادند همراه با افزایش غلظت نمونه‌ها میزان بازدارندگی نیز افزایش می‌یابد که این روند با نتایج نوسو و همکاران (۲۷) کاملاً مطابقت دارد. مطالعات متعددی خاصیت مهار آنزیم آلفاآمیلاز توسط ماکروجلبکها را گزارش داده‌اند (۲۷، ۲۸ و ۲۹). در این مطالعه همه نمونه‌ها فعالیت مهار آنزیم آلفاآمیلاز را نشان دادند و IC_{50} نمونه‌ها در رنج $mg\ mL^{-1}$ ۰/۳۱±۶/۳– ۰/۳۲±۱/۴۳به دست‌آمدکه این میزان با نتایج سنتیل و همکاران (۳۶) که IC_{50} مهار آنزیم آلفا آمیلاز را در عصاره آبی ماکروجلبک قرمز *Gracilaria corticata* و *Gracilaria edulis*، جلبک سبز *Ulva lactuca* و جلبک قهوه‌ای *Sargassum polycystum* بین $\mu g\ mL^{-1}$ ۸۳– ۶۰ گزارش داده‌اند و همچنین با نتایج کومار و سودا (۱۶) که مهار آنزیمی عصاره اتیل استاتی ($mg\ mL^{-1}$ ۰/۳) سه گونه جلبک *Gracilaria gracilis*، *Chondrococcus recimosa* و *Chondrococcus hornemanni* را به ترتیب ۸۱، ۷۳ و ۹۴ درصد گزارش داده‌اند، قابل مقایسه است. اختلافات بین نتایج به دست آمده در مطالعات مختلف را می‌توان علاوه بر گونه جلبکی به نحوه عصاره‌گیری و نوع حلال به کاربرده شده در هر مطالعه نیز مرتبط دانست (۳۴). همان طور که در نتایج این مطالعه نیز مشاهده می‌شود، میزان فعالیت مهارکنندگی سه حلال مختلف مورد استفاده جهت عصاره‌گیری یک گونه اختلاف معنی‌داری را در مهار آنزیم نشان دادند. این چنین اختلافات در بسیاری از مطالعات صورت گرفته، بر روی یک گونه که دارای حلال

و شرایط عصاره‌گیری متفاوتی هستند معمول است (۱ و ۲). به عنوان مثال میزان IC_{50} مهار آنزیم آلفا آمیلاز عصاره آبی جلبک *Ascophyllum nodosum* (μg phenol mL^{-1}) ۱/۳۴) در مطالعات لی و همکاران (۲۰)، ده برابر بیشتر از عصاره الکلی همین جلبک توسط نواسا و همکاران (۲۷)، گزارش شده‌است. نحوه عصاره‌گیری استفاده شده در این مطالعه به صورت پرکولاسیون و بدون در نظر گرفتن ماده خاصی می‌باشد، در حالی که در بسیاری از مطالعات که عصاره‌گیری خالص‌تر و یا با هدف استخراج ماده خاصی بوده‌است نتایج متمایزتری را نشان داده‌اند به عنوان مثال لی و همکاران (۱۹) IC_{50} مهار آنزیم آلفاآمیلاز را توسط عصاره حاوی پلوروتاتین خالص از جلبک قهوه‌ای *Ecklonia cava* در حدود ۹۰ $\mu g\ mL^{-1}$ گزارش داده‌اند که این میزان بسیار کمتر از نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌باشد.

بررسی مهار رادیکال آزاد $ABTS^{+}$ روش بسیار مناسبی جهت سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از طریق اهدای هیدروژن و شکستن زنجیره اکسیداتیو می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، عصاره اتیل استاتی و متانولی هر دو گونه فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد بالاتری را نسبت به عصاره غیرقطبی انهگزانی گونه مربوطه نشان دادند که این نتایج کاملاً با نتایج دیگر محققین که ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی را در گیاهان دیگر گزارش داده‌اند، مطابقت دارد (۹، ۱۳ و ۳۲). تحقیقات به عمل آمده یکی از دلایل ظرفیت بالای پاکسازی رادیکال آزاد در عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی را وجود ترکیبات پلی‌فنلی در این عصاره‌ها دانسته‌اند. ترکیبات فنلی به علت وجود گروههای هیدروکسیلی در موقعیتهای ارتو و پارای آنها، نقش مهمی را در پاکسازی رادیکالهای آزاد ایفاء می‌کنند (۹ و ۱۸). در بسیاری از مطالعات صورت گرفته جلبکهای قهوه‌ای فعالیت بالای پاکسازی رادیکال آزاد را نشان داده‌اند (۸، ۱۱، ۴۳ و ۴۴). در این تحقیق نیز با وجودی که هر دو گونه جلبک ظرفیت پاکسازی رادیکال آزاد بالایی را نشان دادند اما جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* به طور معنی‌داری ظرفیت پاکسازی بالاتری را نسبت به جلبک قرمز *P. perforata* نشان داد.

مشتقات فعال اکسیژن با حمله به ماکرومولکولهای حیاتی بدن از جمله کربوهیدراتها، لیپیدها، پروتئینها و DNA سبب استرس اکسیداتیو و به دنبال آن بروز ناهنجاریها و بیماریهای مختلف از جمله دیابت می‌شوند و همچنین از سوی دیگر بسیاری از ناهنجاری و بیماریها از جمله دیابت با افزایش سطح مشتقات فعال اکسیژن در سلول سبب بروز استرس اکسیداتیو می‌شوند (۴۵ و ۴۶). در این تحقیق عصاره اتیل‌استاتی جلبک *S. angustifolium* در میان نمونه‌های مورد مطالعه، بالاترین فعالیت را در هر دو سنجش ضددیابتی و آنتی‌اکسیدانی $ABST^{+}$ نشان داد. با توجه به اثرات متقابل بین بیماری دیابت و استرس اکسیداتیو می‌توان گفت ممکن است عصاره و گونه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا ضد دیابتی بتواند به ترتیب دارای فعالیت ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی نیز باشد چرا که مهار و کنترل یکی سبب مهار و کنترل دیگری نیز می‌شود که البته برای اثبات مسلم این موضوع به تحقیقات بیشتر و کاملتری نیاز می‌باشد.

در روش FRAP از رادیکالهای آزاد جهت تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانها استفاده نمی‌شود، بلکه از یک واکنش اکسیداسیون احیاء استفاده می‌شود که با تغییر رنگ همراه است. در این روش توانایی احیاء شدن آهن فریک Fe^{+3} به آهن فروس Fe^{+2} توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در نمونه، اندازه‌گیری می‌شود به طوری که زمانی که احیاء کننده واکنش (آنتی اکسیدان) الکترون خود را اهداء می‌کند ماده رنگی تولید می‌شود که از طریق آن می‌توان با سنجش شدت رنگ تولید شده پیشرفت واکنش را اندازه گرفت (۶). همان طور که نتایج نشان دادند همانند ظرفیت پاکسازی رادیکال آزاد همه نمونه‌ها در رنج غلظتی سنجیده شده

فعالیت احیاکنندگی قابل توجهی را نشان دادند. بسیاری از مطالعات انجام شده در زمینه بررسی فعالیت احیاکنندگیFRAP گونه‌های جلبک، ظرفیت احیاکنندگی قابل توجهی را برای آنها گزارش داده‌اند (۱۴ و ۱۵). بر خلاف ظرفیت پاکسازی رادیکال$ABTS^+$ که جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد، در سنجش ظرفیت احیاکنندگی FRAP، جلبک قرمز *P. perforata* بالاترین ظرفیت احیاکنندگی را نسبت به دیگر نمونه‌ها نشان داد. پس می‌توان گفت پتانسیل آنتی اکسیدانی یک ماده آنتی اکسیدان برعلیه رادیکالهای آزاد، ضرورتاً با توانایی آن ماده در احیاء آهن فریک به آهن فروس با هم برابر نمی باشد. همان طور که نتایج نشان دادند عصاره اتیل‌استاتی *P. perforata* بالاترین و عصاره ان‌هگزانی دو گونه *P. perforata* و *S. angustifolium* پایین‌ترین فعالیت احیاکنندگی را نشان دادند ($P<0.05$). مطالعات نشان داده‌اند نوع حلال مورد استفاده در عصاره گیری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار مؤثر می‌باشد (۱) به طوری که در بسیاری تحقیقات صورت گرفته ظرفیت احیاکنندگی عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی بیشتر از عصاره-های غیرقطبی گزارش شده‌است (۲۶). نتایج این تحقیق همانند نتایج ظرفیت پاکسازی رادیکال آزاد، در دو گونه بررسی شده عصاره‌های قطبی (متانولی) و نیمه قطبی (اتیل‌استاتی) نسبت به عصاره غیر قطبی (ان‌هگزانی) فعالیت احیاکنندگی بالاتری را نشان دادند. علت فعالیت بالای عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی را می‌توان به دلیل توانایی استخراج ترکیبات فعال فنلی، فلاونوئیدی، کارتنوئیدها و بسیاری از ترکیبات فعال دیگر توسط این حلالها دانست (۴۱). البته در برخی مطالعات انجام شده عصاره‌های غیر قطبی فعالیت بالاتری را نسبت به عصاره-های قطبی و نیمه قطبی نشان داده‌اند. به عنوان مثال لیم و همکاران (۲۱) فعالیت احیاکنندگی FRAP عصاره غیر قطبی دی‌کلرومتان گونه*Sargassum siliquastrum* را قوی‌تر از عصاره متانولی آن گزارش داده‌اند. بنابراین می‌توان گفت با توجه به اینکه براساس نوع گونه گیاهی ترکیبات استخراج شده توسط حلالهای عصاره‌گیری متفاوت است، بنابراین تفاوت در اثر آنتی اکسیدانی یک حلال از گونه‌های مختلف ماکروجلبکی به دلیل تفاوت در ترکیبات استخراج شده توسط آن حلال می باشد (۳). به طورکلی جلبکها با تولید متابولیتهای اختصاصی و مکانیسمهای دفاعی ویژه قادر به رشد در شرایط مختلف و متغیر محیطی هستند، آنها با تولید آنتی‌اکسیدانها و ترکیبات با وزن مولکولی پایین قادر به پاکسازی رادیکالهای آزاد و غیرفعال کردن مشتقات فعال اکسیژن (ROS) در شرایط استرس محیطی هستند (۳۳).

نتیجه‌گیری

به طورکلی فعالیت مهار آنزیم آلفا آمیلازی و آنتی-اکسیدانی جلبکها علاوه بر نوع گونه جلبکی بلکه به نوع حلال و روش سنجش فعالیت آنها، نیز بستگی دارد. در این تحقیق با وجودی که عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی نسبت به عصاره غیرقطبی فعالیت زیستی بالاتری را نشان دادند اما به طورکلی دو جلبک خوراکی *S. angustifolium* و*P. perforata* با نشان دادن فعالیت مهار آنزیم آلفا امیلاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پاکسازی رادیکال آزاد $ABTS^+$ و احیاکنندگی FRAP قابلیت قرارگرفتن در رژیم غذایی بیماران دیابتی جهت مهار آنزیم آلفا آمیلاز در بیماران دیابتی و همچنین به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قابلیت کاربرد در صنایع پزشکی و داروسازی را دارا می‌باشند. البته مطالعات بیشتری جهت خالص‌سازی ترکیبات مؤثر در این جلبکها و همچنین سنجش آنتی‌اکسیدانی و مهارآنزیمی آنها به صورت زیستی جهت اطمینان از عدم حساسیت جانداران به آنها، پیشنهاد می‌شود.

منابع

۱- سریری ر.، غفوری ح.، نقوی، م.ر. ۱۳۹۴. شرایط استخراج روی توان آنتی‌اکسیدانی و ترکیب بیوشیمیایی آرتیمیزیا آفسنطین. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۲۸(۲): ۲۵۶-۲۵۰.

۲- میمندی ک.، یعقوبی م.م. ۱۳۹۴. اثرات عصاره آبی و اتانولی گل محمدی (*Rosa damascena mill* L.) بر علیه سلولهای سرطانی معده انسان. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۲۸(۲):۳۰۹-۲۹۹.

3- Andersen ØM, Markham KR. 2006. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. eds: Andersen, ØM, Markham, KR. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, Taylor and Francis Group.

4- Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73:239–244.

5- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical biochemistry* 239: 70-76.

6- Berker K, Guclu K, Tor I, Apak R. 2007. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* 72:1157–1165.

7- Ceriello A, Davidson J, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Owens D, Tajima N, Tuomilehto J. 2006. Postprandial hyperglycaemia and cardiovascular complications of diabetes: an update. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease* 16:453–456.

8- Chandini SK, Ganesa P, Bhaskar N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem* 107:707–713.

9- Chakraborty K, Praveen NK, Vijayan KK, Rao GS. 2013. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to Turbinaria spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. *Asian Pac J Trop Biomed* 3:8-16.

10- Fujita H, Yamagami T, Ohshima K. 2001. Fermented soybean-derived water-soluble Touchi extract inhibits alphaglucosidase and is antiglycemic in rats and humans after single oral treatments. *Journal of Nutrition* 131:1211–1213.

11- Gabrielson PW, Widdowson TB, Lindstrom SC. 2006. Keys to the seaweeds and seagrasses of Southeast Alaska, British Columbia, Washington, and Oregon: University of British Columbia.

12- Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. 2000. a-amylase inhibition from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Tea. *Biosci Biochem* 64:1041-1043.

13- Jan S, Khan MR, Rashid U, Bokhari J. 2013. Assessment of Antioxidant Potential, Total Phenolics and Flavonoids of Different Solvent Fractions of Monotheca Buxifolia Fruit. Osong Public Health Res Perspect 4:246-254.

14- Jayalakshmi J, Subramanian V, Anantharaman P. 1993. Evaluation of biochemical composition and in vitro antioxidant properties of selected seaweeds from Jensen A (1993) Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia* 260/261:15–23.

15- Kelman D, Kromkowski PE, McDermid JK, Tabandera KN, Wright PR, Wright DA. 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs* 10:403-416.

16- Kumar SS, Sudha S. 2012. Evaluation of alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory properties of selected seaweeds from Gulf of Mannar. *International research journal of pharmacy* 3:128-130.

17- Kurihara H, Mitani T, Kawabata J, Takahashi K. 1999. Two new bromophenols from the red alga odonthaliacorymbifera. *Journal of Natural Products* 62:882–884.

18- Lapornik B, Prosek M, Wondra GA. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* 71: 214-222.

19- Lee SH, Li Y, Karadeniz F, Kim MM, Kim SK. 2008. a-Glucosidase and a-amylase inhibitory activities of phloroglucinol derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *J Agric Food Chem* 89:1552–1558.

20- Lee SH, Han JS, Heo SJ, Hwang JY, Jeon YJ. 2010. Protective effects of dieckol isolated from *Ecklonia cava* against high glucose-induced oxidative stress in human umbilica endothelial cells. *Toxicology in vitro* 24:375-381.

21- Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J Agric Food Chem* 50:3862–3866.

22- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. 2007. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress. *Curr Med Chem* 14:1729-1738.

23- Matsui T, Oki T, Osajima Y. 1999. Isolation and identification of peptidic alpha-glucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolyzate. *Z Naturforsch* 54:259–263.

24- Matsui T, Ueda T, Oki T, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K. 2001. Alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *J Agric Food Chem* 49:1948–1951.

25- Mellor KM, Ritchie RH, Delbridge LM. 2010. Reactive oxygen species and insulin-resistant cardiomyopathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:222-228.

26- Mole MAS. 2015. Antibacterial and Antioxidant Potential of *Ulva* and *Ectocarpus*. *Indian journal of applied research* 5(5):722-725.

27- Nwosu F, Morris J, Lund VA, Stewart D, Ross HA, McDougall GJ. 2011. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chem* 126:1006–1012.

28- Nagy MA, Ewais MM. 2014. Antidiabetic and Antioxidative Potential of *Cystoseira myrica*. *Am J Biochem* 4: 59-67.

29- Nagarani N, Kumaraguru AK. 2013. Evaluation of anti-inflammatory, antidiabetic, cytotoxic activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Int J Pharm Biol Sci* 4:495-503.

30- O'sulivan AM, Callaghan YC, Grady MN, Queguineur B, Hanniffy D, Troy DJ, Kerrya JP, Brien NM. 2011. In vintro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chem 126:1064-1070*.

31- Park MK, Jung U, Roh C. 2011. Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. *Drugs 9(8):1359-1367*.

32- Praveen NK, Chakraborty K. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory potential of the aqueous extract and polysaccharide fraction from brown marine macroalgae Padina sp. from Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Coastal Life Medicine* 1:38-48.

33- Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M. 2007. Characterization of Polysaccharides Extracted from Brown Seaweeds. *Journal of Carbohydrate Polymer* 69:530–537.

34- Rodeiro I, Olguín S, Santes R, Herrera JA, Pérez CL, Mangas R, Hernández Y, Fernández G, Hernández I, Hernández-Ojeda S, Camacho-Carranza R, Valencia-Olvera A, Espinosa-Aguirre JJ. 2015. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Ulva fasciata (Green Seaweed) Extract and Evaluation of Its Cytoprotective and Antigenotoxic Effects. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine pp:11.

35- Schwartz S. 2006. Is there a rationale for insulin therapy in prediabetic individuals. *Treat Endo crinology* 5:385–393.

36- Senthil SL, Kumar TV, Geetharamani D, Maruthupandi T. 2013. Screening of seaweeds collected from southeast coastal area of India for a-amylase inhibitory activity, antioxidant activity and biocompatibility. *International Journal of* Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5.

37- Shaw JE, Sicree R. 2008. Contemporary Endocrinology: Type 2 Diabetes Mellitus: An Evidence- Based Approach to Practical Management Edited by: M. N. Feinglos & M. A. 2008; Bethel c Humana Press, Totowa, NJ.1.

38- Sohrabipour J, Rabiei R. 1999. A list of marine algae of sea shores of the Persian Gulf and Oman Sea in the Hormozgan province. *Iran Jour Bot* 8:131-162.

39- Suhitha S, Gunasekaran K, Velmurugan D. 2012. Anti-Diabetic and Anti-inflammatory Compounds from Natural Sources–Structure Based Drug Design, 4th National Symposium cum Workshop on "Recent Trends in Structural Bioinformatics and Computer Aided Drug Design" [SBCADD'2012] 20th –23rd.

40- Sugiwati S, Kardono LBS, dan Bintang M. 2006. α-Glucosidase inhibitory activity and hypoglycemic effect of Phaleria macrocarpa fruit pericarp extracts by oral administration to Rats. Journal of Applied Science 6 (10) 2312-2316.

41- Suzuki M, Watanabe T, Miura A, Harashima E, Nakagawa Y, Tsuji K. 2002. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 49:507-511.

42- Vijayabaskar P, Shiyamala V. 2012. Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pacific J. Tropical Biomed 90-98.*

43- Wang H, Chiu LCM, Ooi VEC, Ang JPO. 2010. A potent antitumor polysaccharide from the edible brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*. *Bot* 53:265–274.

44- Wang T, Jónsdóttir R, Liu H, Gu L, Kristinsson HG, Raghavan S, et al. 2012. Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae Fucus vesiculosus. *J Agric Food Chem* 60:5874-5883.

45- West IC. 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17:171–180.

46- Wilson RL. 1998. Free radical and tissue damaging, mechanistic evidence from radiation studies. In Biochemical mechanisms of liver injury. New York, Academic Press. P. 123-125.

47- Youn, JY, Park HY, Cho KH. 2004. Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L.: inhibition of alphaglucosidase. *Diabetes Reserch and Clininical Practice* 66:149–155.

48- Zhang j. 2007. Antidiabetic properties of polysaccharide and polyphenolic-enriched fractions from the brown seaweed Ascophyllum nodosum. *J physiol pharmacol* 85:1116-1123.

Evaluation of antioxidant and α-amylase inhibitory activity of two species *Sargassum angustifolium* and *Palisada perforata*

Kiana Pirian[1], Soheila Moein[2], Jelveh Sohrabi pour[3], Reza Rabeie[3], Khosro Piri[1]

[1] Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

[2] Biochemistry Dept. and Molecular Medicine Research Center, Factually of Medical Science, Hormozgan University, Bandar Abbas, I.R. of Iran

[3] Plant Systematic Dept., Agriculture and Natural Resources Researches Center of Hormozgan, Bandar Abbas, I.R. of Iran

Abstract

Type 2 Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia that results from deficiency of insulin secretion, becoming the third leading cause of death in the world. Reactive oxygen species result in extensive oxidative damage that in turn leads to serious damages in the cells including apoptosis and diabetic. Considering to side effect of synthetic medicines, there has been increased interest in using of natural medicines. In the present investigation, in vitro antioxidant and antidiabetic activity of the methanol, ethyl acetate and n-hexane extracts of two macroalgae species *Sargassum angustifolium* and *Palisada perforata* from the Persian Gulf were analyzed. Algae samples were collected from the Persian Gulf coasts and extracted by Percolation method. α-amylase inhibition activity of different concentration of extracts was analyzed using the DNSA method and also their antioxidant activity was analyzed using the ABTS radical scavenging and FRAP reducing activity methods. The ethyl acetate extracts of *S. angustifolium* and *P. perforata* showed the highest and lowest enzyme inhibition activity, respectively ($P<0.05$). Also the highest $ABTS^+$ scavenging and FRAP reducing were observed in the ethyl acetate extracts of *S. angustifolium* and *P. perforata*, respectively ($P<0.05$). Generally, polar and semi polar extracts of two macroalgae species significantly showed the higher antioxidant activity comparing to their nonpolar extracts. Also *S. angustifolium* exhibited the highest activity in both free radical scavenging and α-amylase inhibition assays. However, enzyme inhibition and antioxidant activity of two edible studied algae revealed that these macroalgae species can be used directly in human diet and also indirectly in medical and pharmaceutical application.

Key words: Macroalgae, Persian Gulf, α-amylase enzyme, *Sargassum angustifolium, Palisada perforata*