CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار استروئیدهای جلبکها *Padina boergesni* و *Sargassum glaucescens* دریای عمان

مجری :
شهلا جمیلی

شماره ثبت
۴۸۴۵۴

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور

عنوان پروژه : جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار استروئیدهای جلبکها *Padina boergesni* و *Sargassum glaucescens* دریای عمان

شماره مصوب پروژه : ۸۹۱۸۰-۱۲-۷۸-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : شهلا جمیلی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : شهلا جمیلی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : سودابه سعیدنیا – معصومه نصیری- پریسا پرمه- قرنجیک- ملیکا ناظمی- سلیم جدگال- گل محمد سوپک- منصور صدریان
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): احمدرضاگوهری کاخکی
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): محمدرضا حسینی

محل اجرا : استان سیستان و بلوچستان
تاریخ شروع : ۸۹/۷/۱
مدت اجرا : ۲ سال و ۶ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۴

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار استروئیدهای جلبکها *Padina boergesni* و *Sargassum glaucescens* دریای عمان

کد مصوب : ۸۹۱۸۰-۱۲-۷۸-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۸۴۵۴ تاریخ : ۹۴/۱۰/۲۰

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم شهلا جمیلی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بیولوژی دریا می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان مورد ارزیابی و با رتبه متوسط تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده□ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- اهداف طرح ۲
۱-۲- مطالعات انجام شده در جهان ۳
۱-۳- مطالعات انجام شده در ایران ۳
۲- کلیات ۴
۲-۱- خلیج فارس ۴
۲-۲- موجودات خلیج فارس ۴
۲-۳- جلبک‌های ماکروسکوپی ۴
۲-۴- اهمیت اقتصادی جلبک‌های ماکروسکوپی ۵
۲-۵- کاربردهای دارویی و پزشکی جلبک‌های ماکروسکوپی ۵
۲-۶- شیمی جلبک‌های قهوه‌ای ۵
۲-۷- استرول‌های جلبک‌های قهوه‌ای ۶
۲-۸- فراوانی و پراکنش ۶
۲-۹- بیولوژی جلبک قهوه ای جنس پادینا (*Padina*) ۷
۲-۱۰- اکولوژی جنس پادینا ۷
۲-۱۱- بیولوژی جلبک قهوه‌ای جنس سارگاسوم (*Sargassum*) ۷
۲-۱۲- عادت‌ها و ساختار جلبکی ۸
۲-۱۳- جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی ۸
۳- مواد و روشها ۱۰
۳-۱- مواد، وسایل و دستگاههای مورد استفاده ۱۰
۳-۲-جمع آوری، خشک و پودر کردن جلبک ۱۱
۳-۳- عصاره گیری ۱۱
۳-۴- جداسازی ترکیبات موجود در فراکسیون اتیل استاتی جلبک *S .oligocystum* ۱۴
۳-۵- جدا سازی ترکیبات A'، B'، C'، D' و E' از فراکسیون اتیل استاتی *S.oligocystum* ۱۴
۴- نتایج ۱۷
۴-۱- بازدهی عملیات عصاره گیری ۱۷

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۴-۲- نتایج جداسازی ۱۷

۴-۳- مشخصات جسم C′ ۲۰

۴-۴- مشخصات جسم E ۲۱

۴-۵- ارزیابی درصد عصاره های مختلف ۲۱

۴-۶- تفسیر ترکیب A (A′) ۲۲

۴-۷- تفسیر ترکیب B (B′) ۲۳

۴-۸- تفسیر ترکیب C′ ۲۴

۴-۹- تفسیر ترکیب E′ ۲۵

۴-۱۰- جدا سازی استروئیدها از پادینا ۲۶

۴-۱۱- جدا سازی استروئیدها از *Nizamudiinia zanardinii* ۲۷

۴-۱۲- بحث و تفسیر نتایج حاصل از جداسازی ترکیبات موجود در هر سه جلبک مورد مطالعه *Gp.p27ersica* و *S.oligocystum* ، *Padina boergesni* و *Nizamudiinia zanardinii* ۲۷

منابع ۳۱

چکیده انگلیسی ۳۴

چکیده

در این تحقیق شناسایی ترکیبات طبیعی جلبکهای قهوه ای *Padina boergesni* ، *Sargassum oligocystum* و *Nizamudiinia zanardinii* و جلبک قرمز *Glacilariopsis persica* از سواحل استان سیستان و بلوچستان (سواحل خلیج‌فارس و دریای عمان) جمع‌آوری، خشک، وخرد شدند. جلبکهای قهوه‌ای مذکور توسط حلال‌های کلروفرم-متانول (۱-۳) و آب مورد عصاره‌گیری قرار گرفتند. با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی TLCو CC با فاز ساکن سیلیکاژل فاز نرمال سفادکس LH-20 و HPLC ترکیبات کلسترول ۲۲دی هیدروکلسترول از فراکسیون متانولی *Gp.persica* و تر کیبات کلسترول، ۲۲ دی هیدروکلسترول، فوکوسترول، اوستراسترول وسارینگسترول و استیگما استرول از فراکسیون اتیل استاتی *S.oligocystum* و در جلبک *Padina boergesni* ترکیبات کلسترول، ۲۲ دی هیدروکلسترول و کالیناسترول و از جلبک قهوه ای *Nizamudiinia zanardinii* فوکسترول ، 24(R)-hydroperoxy-24-vinylcholestrol

، 24(R)-hydroxy-24-vinylcholestrol، 24(S)-hydroperoxy-24-vinylcholestrol

و 24(S)-hydroxy-24-vinylcholestrol جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفتند. در طول جداسازی از معرف انیس آلدئید جهت ظهور لکه‌ها بر روی TLC استفاده شد. شناسایی این ترکیبات با استفاده از روش‌های مختلف اسپکترو سکوپی مانند: ، $^{1}H-NMR$ $^{13}C-NMR$، Mass میسر گردید.

کلمات کلیدی: عصاره گیری، استروئیدها، جلبکهای دریایی، *Padina boergesni* ، *Sargassum oligocystum* ، *Glacilariopsis persica*، *Nizamudiinia zanardinii* دریای عمان، ایران

۱- مقدمه

ترکیبات طبیعی از دورهٔ باستان به عنوان مهمترین منبع تهیه داروها مورد توجه بوده‌اند. در سال های اخیر گرایش جدیدی به جداسازی ترکیبات اصلی از منابع طبیعی مشاهده می‌شود. علت این امر در دسترس بودن بیشتر این ترکیبات و تهیه آنها از منابع تجدید شدنی، سمیت کننده ترکیبات طبیعی و نیز کم هزینه بودن تهیه اغلب آنها نسبت به ترکیبات شیمیایی و سنتزی می باشد (Vilientinck, 2007) .حداقل دو سوم ترکیبات آنتی کانسری که امرئزه مورد استفاده قرار می گیرند یا مستقیما از ارگانیزم های زنده جدا شده اند ویا مشتقات نیمه سنتتیک ترکیبات طبیعی می باشند(Cragg,1997). اولین قدم در راه دستیابی و تکامل دارو های آنتی کانسر از منابع طبیعی،انجام تست های غربالگری می باشد. به کارگیری تست های غربالگری مناسب در حوزه مطالعه خالص شدن ترکیبات طبیعی موجب هدفمند شدن امر جداسازی، تسریع در شناسایی ترکیبات فعال و کاهش هزینه می گردد. این مسئله کمتر مورد توجه محققین قرار گرفته است. به منظور دستیابی و تکامل واحدهای آنتی کانسر از منابع طبیعی به یک سری آزمایش های غربالگری عصاره های خام نیازمندیم.

فیتوشیمی دانش بررسی و مطالعه ترکیبات شیمیایی گیاهی است. به بیان دیگر می توان گفت شاخه ای از علم شیمی است که موضوع آن مطالعه ترکیبات شیمی گیاهان است از جمله این ترکیبات، متابولیت های ثانویه گیاهی است. تکنیک‌های رایج در این علم عبارتند از استخراج و جداسازی، تغلیظ آنالیز و تکنیک‌های کروماتوگرافی که در نهایت شناخت ساختار ها ی دقیق و مسیرهای بیوسنتزی را امکان پذیر می سازد. امروزه استخراج مواد طبیعی از جلبک ها با کاربردهای متفاوت در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، مصارف دارویی – کنترل آلودگی و غیره بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. و لازمه این امر جداسازی و شناسایی ترکیبات اصلی این جلبک‌ها مطالعه اثرات سیتوتوکسیک آنها می باشد.

۱-۱- اهداف طرح

امروزه استروئیدهای جلبکی به لحاظ اثرات بیولوژیک شاخص جهت تهیه داروها و دیگر مصارف بسیار مورد توجه می باشد. خلیج فارس و دریای عمان دارای جلبک های اقتصادی و دارویی فراوانی است که تا به حال مورد بررسی فیتوشیمیایی قرار نگرفته اند .اهداف کلی موردنظر شناسایی ترکیبات طبیعی جلبک قهوه ای *Padina boergesni* و جلبک قهوه‌ای *Sargassum oligocystum* می باشد.

و اهداف اقتصادی، شامل جداسازی و خالص سازی ترکیبات اصلی موجود در جلبک مذکور (با تاکید بر استروئیدها) و تعیین ساختمان ترکیبات خالص شده با روش های اسپکترسکوپی می باشد.

در این تحقیق فرض بر این گذاشته می شود که عصاره های جلبک های مذکور دارای اثر سیتوتوکسیک بوده و بررسی های مربوط به جداسازی ترکیبات آنها منجر به شناسایی استروئیدهای اصلی جلبکی شود.

۲-۱- مطالعات انجام شده در جهان

- در سال ۲۰۰۸ پاسکالوا و همکارانش تحقیقاتی را بر روی جلبک *S.fusiformis* انجام دادند و نتایج نشان داد که فراکسیون SP4-2 این جلبک با LC_{50} حدود $3/7\ \mu gr$ تا ٪۸۹/۹ بر روی ویروس HIV-I اثر بازدارندگی دارد (Paskalva et al.2008).
- در سال ۲۰۰۹ ناتارجان و همکارانش به بررسی عصاره متانولی جلبکهای *G-gracilis* و *cladophora fasicularis* پرداختند. نتایج این مطالع حاکی از آن بود که عصاره‌های جلبک‌های مذکور دارای خاصیت بازدارندگی بر روی آنزیم کولین استراز (ChE) می‌باشند. درواقع می‌توان از این اثر در جهت تکامل و ساخت داروهای بیماری‌های عصبی به‌ویژه پارکینسون و آلزایمر بهره برد (Natarajan et al. 2009) .
- در سال ۱۹۵۷، آکاجی و همکارنش به بررسی فیتوشیمیایی جلبک قهوه‌ای *Sargassum ringgol dianum* پرداختند و موفق به استخراج استروئیدی به نام سارگاسترول از این جلبک شدند (Akagi et al. 1957).
- در سال ۲۰۰۸ جاویر و همکارانش تحقیقی را در زمینه میزان استخراج آگار در مقایسه با فصل‌ها پرداختند. بدین‌منظور جلبک‌های قرمز خانواده *Gracilariaceae* مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داده است که بیشترین میزان محصول آگار از جلبک ***G*-vermicalophylla** و در فصل تابستان و کمترین میزان محصول آگار از *G-longissima* در فصل بهار و پاییز بوده است (Javier et al. 2008).
- در سال ۲۰۰۹ پژوهشی در زمینه فیتوشیمیایی بر روی جلبک قهوه‌ای *S.tenerrimum* انجام شد که منجر به جداسازی پلی ساکاریدی به نام "سولفات فاکوییدان" شد، پلی ساکارید مذکور بر روی ویروس HSVs اثر بازدارندگی نشان داد (Sinha et al. 2009).
- در سال ۱۹۹۸، گروهی از محققان طی بررسی فیتو شیمیای جلبک قرمز *Gp.Lemaneformis* موفق به استخراج پیرول‌های جدید از جلبک مذکور شدند (Jiang et al. 1998).

۳-۱- مطالعات انجام شده در ایران

در سال ۱۳۸۷، کیوان زندی و همکارانش به بررسی اثر ضد ویروسی جلبک *G.Salicornia* جمع‌آوری شده از خلیج فارس پرداختند و نتایج حاکی از آن بود که عصاره‌های جلبک مذکور دارای اثر بازدارندگی بر روی ویروس HSV-2 می‌باشند (Zandi et al. 2007) .

از دیگر مطالعات انجام شده پیرامون جلبکها در ایران می‌توان به استخراج آگار از گونه‌های مختلف جلبک *Gracilaria* اشاره کرد. (Bugherpour et al.2007) .

در سال ۱۳۷۶، مرجان درهمبخش به بررسی اثر ضدقارچی عصاره‌های جلبک *Sargassum heris* پرداخت. جهت این پژوهش ابتدا گیاه توسط سه حلال اتانول- متانولی و آبی عصاره‌گیری شد و سپس با استفاده از روش تعبیه چاهک، دیکس‌گذاری بر روی قارچ‌ها به آزمایش گذارده شد. نتایج حاکی از آن بود که عصاره اتانولی اثر

ضد قارچی از نوع کشندگی دارد. عصاره متانولی نیز تا حدودی دارای اثر ضد قارچی بوده و عصاره‌ی آبی به‌طور کل فاقد هرگونه اثر ضدقارچی می‌باشد (Darhambakhsh, 1376).

۲-کلیات

۲-۱-خلیج فارس

این محدوده دریایی در غرب طول جغرافیایی ۵۶ درجه شرقی است و گسترش آن به موازات محور NW/SE از تنگه هرمز تا سواحل شمال غربی ایران است. خط ساحلی به طول حدود ۱۰۰۰ کیلومتر و مساحت آن ۲۳۹/۰۰۰ کیلومتر مربع است. این دریا در حقیقت محیط نیمه بسته کم عمقی است که عمق متوسط آن حدود ۳۵ متر با حداکثر عمق بین ۹۰ تا ۱۰ متر در سمت شمال شرقی سواحل ایران و حدود ۱۰۰ متر نزدیک به تنگه باریک هرمز است. این تنگه باعث اتصال دریا به خلیج عمان و دریای عرب می‌شود.

(Emery, 1956; kasslar, 1973)..

حداکثر عرض این دریا ۳۳۸ کیلومتر است و تخمین زده می‌شود که حجم آن برابر با حدود ۷۸۰۰ کیلومتر مکعب (Linden et al;1990) و یا حدود ۸۷۳۰ کیلومتر مکعب (Reynolds, 1993) باشد. کم‌عمقی این دریا باعث شده تا شدیداً تحت تأثیر متغیرهای جوی قرار گیرد. با توجه به احاطه شدن توسط ارتفاعات مرتفع و سرزمین‌های پست در طرفین شمالی، جنوبی، میزان تبخیر در آن تشدید شده و باعث افزایش تبادلات آبی از میان تنگه هرمز می‌شود.

۲-۲- موجودات خلیج فارس

جانداران خلیج فارس مانند تمام آبهای گرمسیری و نیمه گرمسیری از تنوع فراوانی برخوردارند. در خلیج فارس انواع مختلفی از ماهی، میگو، صدف، جلبک، مرجان و .... یافت می‌شوند. وجود سواحل صخره‌ای و شرایط زیست محیطی مناسب، رویش جلبک‌های ماکروسکوپی را در سواحل و جزایر خلیج فارس مناسب نموده است.

۲-۳- جلبک‌های ماکروسکوپی

جلبک‌های ماکروسکوپی دریایی که معمولاً به‌صورت بنتوزی می‌باشند تحت عنوان seaweed شناخته می‌شوند. به گروه ابتدایی گیاهان غیرگلدار تعلق دارند که تالوفیت‌ها می‌باشند. این گروه از گیاهان مجموعه آشکاری از تولیدکنندگان اولیه را در مناطق جزر ومدی و زیر جزر و مدی تشکیل می‌دهند. بیشتر جلبک‌های دریایی از نظر پراکنش از نواحی بین جزر و مدی تا ناحیه کم عمق زیر جزر و مدی محیط‌های دریایی محدود می‌گردند. اختلافی

در الگوی پراکنش آنها وجود دارد به توانایی سازگاری آنها به شرایط اکولوژیک محدود در زیستگاه‌هایشان برمی‌گردد.

۲-۴- اهمیت اقتصادی جلبک‌های ماکروسکوپی

از آنجائیکه برخی از این جلبک‌ها دارای مواد با ارزشی نظیر: آگار، کاراگینان، و آلژینات، اسیدهای چرب ضروری، املاح معدنی، ویتامین‌ها و غیره می‌باشند کاربردهای فراوانی در صنایعی از قبیل، صنایع کاغذسازی، نساجی، علوم پزشکی و داروسازی و غیره هستند، بسیاری از گونه‌ها به‌طور مستقیم به‌عنوان سبزی و سالاد، چاشنی سوپ به‌کار می‌روند. مردم ژاپن مدت طولانی است که از جلبک‌های دریایی به‌عنوان ماده خام اولیه در رژیم غذایی خود به‌کار می‌برند. (Kaladharan, 1999; Abbot,1995) .

۲-۵- کاربردهای دارویی و پزشکی جلبک‌های ماکروسکوپی

با تحقیقات و آزمایش‌های به‌عمل آمده در بسیاری از جلبک‌ها آثار دارویی نظیر: ضد قارچی، ضد باکتری، ضد ویروسی، خواص آنتی‌بیوتیکی، ضد تومور، کاهنده کلسترول خون، درمان گواتر، سل، درد مفاصل، التیام سوختگی، بند آمدن خونریزی، کاهنده تب کودکان مشخص شده است (Trono, 1997).

۲-۶- شیمی جلبک‌های قهوه‌ای

این جلبک‌ها به‌خاطر دارا بودن رنگدانه قهوه‌ای و یا ترکیبی از چند رنگدانه به رنگ قهوه‌ای مشاهده و لذا به این نام خوانده می‌شود. انتشار جغرافیایی آنها بیشتر در سواحل اقیانوس ها و دریاهای سردتر بوده و عمدتاً بر روی صخره‌ها می‌رویند. و تا نواحی جزر و مدی ادامه دارد. به‌طور کلی از این جلبک‌ها به‌خاطر داشتن ازت و پتاسیم فراوان در تهیه کودهای پتاسه یا ازته استفاده می‌شود. ثانیاً از دیواره سلول‌های آنها مواد کلوئیدی خاصی (آلژینات‌ها) استخراج می‌شود که دارای مصارف دارویی و صنعتی می‌باشد. همچنین مواد طبیعی استخراج شده از این جلبک‌ها اثرات آنتی‌باکتریایی مشهودی بر روی برخی باکتری‌ها نشان داده‌اند. از مشهورترین جنس‌های این گروه جلبک سارگاسوم "*Sargassom*" می‌باشد.

مواد طبیعی استخراج شده از جلبک‌های قهوه‌ای عبارتند از:

۱- بتائین‌ها، استرول‌ها
۲- پلی هیدروکسی فنل‌ها
۳- دی ترپنوئیدها و سزکوئی ترپنوئیدها
۴- فنل‌های آسیله
۵- ترکیبات نیتروژن‌دار

۶- کربوهیدراتهای پلی مریک
۷- کربوهیدراتهای جلبکی با فعالیت ضد توموری
۸- کربوهیدراتهای با خاصیت ضد انعقاد خون.

۲-۷- استرول‌های جلبک‌های قهوه‌ای

استرول‌های گروهی از ترکیبات آلی هستند که به‌صورت طبیعی در گیاهان خشکی، جلبک‌ها، قارچ‌ها، جانوران و ... وجود دارند. یکی از آشناترین فرم‌های استرول، کلسترول است که برای انجام فعالیت‌های سلولی. ساختن ویتامین‌ها و هورمون‌های استروئیدی و ... به‌کار می‌رود. به استرول‌های گیاهی فیتواسترول اطلاق می‌شود. از فیتواسترول‌های تا حدودی مشترک بین گیاهان خشکی و جلبک‌ها می‌توان به سیتواسترول و استیگمااسترول اشاره کرد. (Ostlond RE; Racette SB,2003).

از استرول‌های گزارش شده از جلبک‌های قرمز می‌توان به کلسترول (Cholestrol)، دسمواسترول (Desmosterol)، و بتا سیتواسترول و از جلبک‌های قهوه‌ای فوکوسترول، (Fucosterol)، سارینگوسترول ۲۲ متیلن کلسترول، سارگا سترول اشاره کرد. (Glenn w.Paterson,2006).

با افزودن استرول‌های جلبکی به رژیم غذایی می‌توان میزان کلسترول پلاسما را کاهش داد. همچنین نباید تحقیقات انجام شده افزودن سارگارسترول و فوکوسترول از جلبک قهوه‌ای جنس *Sargassum* کلسترول پلاسما را تا ۵۹ درصد پایین می‌آورد. همچنین کلسترول بعنوان پیش ساز هورمون های استروئیدی (استروئیدهای جنسی، گلوکوکورتیکوئیدها و مینرالوکورتیکوئیدها) واسیدهای صفراوی عمل می کند.

۲-۸- فراوانی و پراکنش

بر اساس مطالعات مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، در نمونه برداری های منطقه بین جزر و مدی و زیر جزر و مدی که بصورت فصلی صورت گرفت، نتایج آماری نشان داد که بیشترین فراوانی در فصل پاییز و زمستان به جلبک های قهوه ای (دو گونه سارگاسوم و سیستوسیرا) و در اواسط زمستان تا اواخر آن بیشترین تنوع و فراوانی به جلبکهای قرمز مربوط می شود، در حالیکه بیشترین فراوانی جلبک های سبز در فصل بهار می باشد.

- از گونه های مهم جلبک های منطقه سیستان و بلوچستان می توان به گونه های زیر اشاره کرد:

ـ جلبک سبز ulva sp

ـ جلبکهای قرمز

ـ *Hypnea sp*

ـ *Botryocladia Leptopoda*

ـ *Halymenia Porphyra formis*

- *Sebdenia felabellata*
- *Gelidium sp*
- *Gelidiella sp*
- *Gracilaria sp*
- جلبکهای قهوه ای
- *Sargassum* sp
- *Nezimodima* sp
- *Padina* sp
- *Cystoseria indica*

۹-۲- بیولوژی جلبک قهوه ای جنس پادینا (*Padina*)

رنگ جلبک قهوه ای تیره. دارای چندین لوب شکننده بادبزنی شکل با شکافهای عمیق.

لبه در قاعده باریک و بسمت بالا پهن.

موهای متمرکز ردیفی در سطح بالایی و پایینی برگ.

اسپوروسیت ها متمرکز در سورهای کروی و بصورت خطی. در بعضی قسمتها کمی سفید رنگ ناشی از رسوب کلسیم بر اثر نور.

چسبیده به بستر صخره ای با نگاهدارنده صفحه ای با پایه بلند.

طول تال ۱۵-۲۰ سانتی متر.

۱۰-۲- اکولوژی جنس پادینا

محل رویش جلبک معمولا در محدوده منطقه بین جزرومدی روی سطح بسترهای صخره ای.

پراکنش کم و بیش در استانهای هرمزگان (جزایر قشم، هرمز و لارک) و سیستان و بلوچستان (گواتر، بریس، چابهار، گوردیم و تنگ) در فصول پاییز و زمستان.

۱۱-۲- بیولوژی جلبک قهوه‌ای جنس سارگاسوم (*Sargassum*)

سارگارسوم از دسته جلبک‌های قهوه‌ای است که تاکنون حدود ۱۵۰ گونه از سارگاسوم در سطح دنیا شناخته شده است. برخی گونه‌ها مانند *S.filipendula* در اتصال به صخره و تکیه‌گاه رشد می‌نمایند. برخی گونه‌ها مانند *S.natans* آزادانه شناور هستند. برخی نمونه‌ها تنها از طریق رویشی و از قطعات جدا شده رشد نموده و به صورت انبوهی در زیستگاه‌های مناسب رشد و تکثیر حاصل می‌نمایند.

سارگاسوم متعلق به دریاهای گرم می‌باشد. در خلیج فارس و سواحل دریای عمان چند گونه از سارگاسوم یافت می‌شود و گاه نیز به‌صورت انبوهی رشد می‌نمایند.

بعضی سارگاسوم را جلبک خلیج می‌نامند. یک گونه از سارگاسوم به نام *S.natans* به حدی در نواحی و اطراف خلیج مکزیک فراوان است که آبهای آن نواحی را دریاهای سارگارسو[1] می‌نامند. بسیاری از گونه‌های سارگاسوم در دریاهای گرم، و در سواحل صخره‌ای و در نواحی جزر و مدی یافت می‌شوند. (کیان مهر، ۱۳۸۴).

۲-۱۲- عادت‌ها و ساختار جلبکی

سارگاسوم دارای ساختار مورفولوژیکی بسیار پیشرفته و پیچیده‌ای است وضعیت گیاهان پیشرفته خشکی و گیاهان گلدار را به خوبی تقلید می‌کند. دارای اندام‌های ریشه مانند (نگاهدارنده)، ساقه مانند و برگ مانند و گل آذین مانند می‌باشد و نظم انشعابات در محور اصلی و وضعیت تناوبی اجزاء ممکن است بیننده را به اشتباه بیاندازد و تصور کند که گیاه آوندی و گلدار است.

گل آذین مانندهایی در محل انشعابات جانبی برگها، رسپتاکل‌های فراوانی ایجاد شده و ظاهر پر شاخ و برگ و انبوهی به گیاه می‌دهند. سارگاسوم تمایزی بافتی مشخصی را نشان می‌دهد. در طرح بافتی شباهت زیادی را به گیاهان پیشرفته خشکی نشان می‌دهد. سارگاسوم فاقد هرگونه تولید مثل غیرجنسی و زوسپورهای غیرجنسی می‌باشد. لیکن در بسیاری از گونه‌ها تکثیر از طریق رویشی و قطعه قطعه شدن گیاه بالغ بسیار متداول می‌باشد. علاوه بر تهیه آلژینات، این جلبک‌ها حاوی مقادیر بالای ید و ویتامین C نیز هستند (Kamel, 1981).

۲-۱۳- جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی

در سال‌های اخیر گرایش جدیدی به جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی مشاهده می‌شود.

به‌کارگیری تست‌های غربالگری مناسب در حوزه مطالعه و خالص‌سازی ترکیبات طبیعی موجب هدفمند شدن امر جداسازی، تسریع در شناسایی ترکیبات فعال و کاهش هزینه‌ها می‌گردد. با این وجود، این مسئله کمتر مورد توجه محققین قرار گرفته است. (MaLaughlin, 1998)

آزمون‌های بیولوژیک به ۴ گروه پیش‌غربالگری[2]، غربالگری[3]، پایش[4] و تست‌های ثانویه[5] تقسیم می‌شوند.

تست‌های پیش غربالگری بر روی تعداد زیادی از نمونه‌های اولیه به منظور یافتن هر گونه فعالیت بیولوژیک در آنها انجام می‌شوند. این آزمونمها باید سریع بوده با هزینه کم قابل انجام باشند و از ظرفیت بالایی جهت بررسی

[1] - Sargasso seas
[2] - Prescreening
[3] - screening
[4] - monitoring
[5] - secondary tests

تعداد زیادی نمونه برخوردار باشند. اغلب این آزمونها کیفی می‌باشند. آزمایشات غربالگری، جهت انتخاب ترکیبات برای ورود به مرحله تست‌های ثانویه انجام می‌شوند و شیوه‌های پایش به منظور هدفمند کردن فراکسیناسیون عصاره‌های تام و جداسازی ترکیبات خالص از آنها به‌کار گرفته می‌شوند. این آزمایشات نیز باید سریع و ارزان بوده و ظرفیت بالایی داشته باشند. درتست‌های ثانویه، ترکیبات خالص به دست آمده از مراحل قبل برای ورود به مراحل بالینی دست‌چین می‌شوند. به این ترتیب، تست‌های ثانویه اختصاصی و گران‌تر بوده، در مدت زمان طولانی‌تری قابل انجام هستند و ظرفیت پایینی دارند. (Suffness, 1991).

لازم به ذکر است که در همه برنامه‌های غربالگری مراحل پیش‌غربالگری و غربالگری مجزا از یکدیگر نمی‌باشند و درصورتی که آزمون مورد استفاده به اندازه کافی انتخابی باشد و توان کاهش شمار ترکیبات فعال به تعداد قابل ورود به مرحله آزمون ثانویه را داشته باشد، نیازی به انجام آزمایشات پیش‌غربالگری نبوده و می‌توان از آن صرف نظر کرد. شیوه‌های مورد استفاده جهت پایش جداسازی نیز ممکن است همان تست‌های مورد استفاده جهت غربالگری باشند (Suffness,1991).

۳-مواد و روش ها

۱-۳-مواد، وسایل و دستگاههای مورد استفاده

۱- ظروف وسایل شیشه ای شامل: بشر در ابعاد مختلف، ارلن، لوله آزمایش، قیف، پیپت، میله های شیشه‌ای ،مزور، لوله موئین، پیپت پاستور، بالن و ...

۲- آسیاب برقی

۳- دستگاه تقطیر در خلأ دوار

۴- دستگاه فریز درایر

۵- بن ماری

۶- انکوباتور

۷- تخم های آرتمیا سالینا (تهیه شده از مرکز شیلات تهران)

۸- آکواریوم جهت نگهداری لاروهای آرتمیا سالینا

۹- پمپ هوادهی

۱۰- لامپ با نور سفید

۱۱- سمپلر ۵۰۰ میکرولیتر

۱۲- لوپ

۱۳- پلیت‌های میکروتیتر ۲۴ خانه

۱۴- سشوار جهت خشک کردن ظروف

۱۵- NaCl (Merck)

۱۶- کمک حلال های DMSO و تونین ۸۰

۱۷- حلال اتیل استات، متانول، آب، اتر دوپترول، هگزان و کلروفرم (Kiankaveh)

۱۸- ستون های کروماتوگرافی در ابعاد مختلف

۱۹- پایه های نگهدارنده ستون

۲۰- تانک TLC

۲۱- صفحات TLC با فاز ساکن سیلیکاژل (Riedel-deHaen-DC-CardsSIF, 0.2mm)

۲۲- سیلیکاژل فاز نرمال (مش ۲۱۰-۷۰)

۲۳- سفادکس _ LH 20

۲۴- معرف انیس آلدئید

۲۵- لامپ UV با طول موج ۲۵۴ nm

۲۶- طیف سنج تشدید رزونانس مغناطیسی هسته ای(Bruker ;500 MHz)

۲۷- طیف سنج جرمی (EI-MS Finigan-mat)

۲۸- HPLC (Knaver,smartline 2600)

۲۹- حلال $CDCL_3$, $DMSO-d_6$ (Merck)

۳۰- ترازوی دیجیتال

۳۱- رنگ پاش

۳۲- بربرین هیدروکلراید(Fluka) به عنوان کنترل مثبت آزمونBST

۳۳- Mantel

۳۴- سیستم تقطیر جهت تقطیر نمودن حلال های بشکه ای

۲-۳-جمع آوری، خشک و پودر کردن جلبک

نمونه برداری جلبک های *S. oligocystum, Padina boergesni* از سواحل استان هرمزگان و استان سیستان و بلوچستان از شهریور تا بهمن ۱۳۹۰ صورت گرفت.

در آزمایشگاه نمونه ها به تفیک هم ایستگاه در تشت ریخته و بوسیله آب شیرین شسته شده و از مواد زائد و اپی نیت جدا می گردند. سپس نمونه ها به تفکیک گونه ای جدا گشته و توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم توزین می شوند و بعد نمونه ها در آون خشک می شوند. خشک کردن نمونه ها در درجه حرارت ۷۰°C در مدت زمان ۲۴ ساعت کفایت می نماید.

شناسایی: شناسایی اولیه جلبکی با استفاده از خصوصیات ظاهری صورت گرفته و سپس شناسایی نهایی با استفاده از کیت کلیدی موجود.(Borgesen,1939;Tseng,1983;Richardson,1975;Gavino and Trono Trono1989)

مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند. و سپس به قطعات کوچکتر خود شدند.

۳-۳-عصاره گیری

فرآیند عصاره گیری به منظور جدا کردن ترکیبات حل شده در یک محلول و یا خارج کردن برخی ترکیبات از یک مخلوط جامد صورت می گیرد.روش های مختلفی جهت بدست آوردن ترکیبات آلی موجود در بافت های گیاهی وجود دارد. مانند خیساندن[6]، پرکولاسیون[7]، دایجسشن[8]، دم کردن[9] و ... که هر یک از این روش ها با توجه به نوع بافت های گیاهی و نوع ماده جدا شدنی انتخاب می شوند. (صمصام شریعت، ۱۳۷۱).

در این پروژه از روش پرکولاسیون جهت عصاره‌گیری استفاده شده است. در این روش ماده جامد موردنظر بصورت قطعات خرد شده درآمده و مقداد معین حلال، در دوره زمانی یعنی حداقل سه روز در پرکولاتور در

---

6 . Maceration
7 . Percolation
8 . Digestion
9 . infusion

معرض حلال های مورد نظر قرار می گیرد. مخلوط حاصل در نهایت صاف و تغلیظ می گردد. پرکولاسیون معمولاً در دمای اتاق و با چند حلال متوالی انجام می شود. (صمصام شریعت، ۱۳۷۱). ورود ترکیبات آلی به حلال، از قانون انتشار تبعیت می کند و درصورتی که حلال مورد استفاده به چند قسمت تقسیم شود و عمل عصاره گیری در چند مرحله انجام شود. نتایج و بازدهی نهایی بسیار بهتر از زمانی است که این عمل با همان مقدار حلال اما تنها در یک مرحله انجام می شود (vogel, 1954).

به این ترتیب، قطعات خرد شده جلبک *S. oligocystom* (۷۰۰گرم) توسط حلال های کلروفرم: متانول (۳:۱) طی روش پرکولاسیون در دمای اتاق تحت عصاره گیری قرار گرفتند، قطعات خرد شده جلبکی، سه بار و هر بار به مدت ۴۸ ساعت به ترتیب در معرض حلال های ذکر شده قرار گرفتند. عصاره های حاصله پس از صاف شدن، توسط دستگاه خلأ دوار تغلیظ و توسط فریز درایر کاملاً خشک، توزین وتا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. سپس عصاره خشک شده جلبک *S.oligocystum* به دو فاز آبی و اتیل استاتی دکانته شد. در نهایت دو بخش عصاره ی آبی و اتیل استاتی پس از سه بار دکانته شدن بدست آمد.عصاره های حاصل مانند روش قبل خشک و توزین گردید.

شکل ۱-۳- عصاره گیری در پرکولاتور

شکل ۲-۳- جدا کردن دو فاز آبی و اتیل استاتی به وسیله قیف دکانتور

شکل ۳-۳- تغلیظ عصاره ها با دستگاه تقطیر در خلأ دوار

شکل ۴-۳- خشک کردن عصاره ها به وسیله دستگاه فریز درایر

۴-۳- جداسازی ترکیبات موجود در فراکسیون اتیل استاتی جلبک *S .oligocystum*

انجام مطالعات آماری بر روی نتایج حاصله فراکسیون اتیل استاتی *S. oligocystum* برای ردیابی و جداسازی ترکیبات مورد استفاده قرار گرفت به این منظور از کروماتوگرافی ستونی با فاز ساکن سیلیکاژل، سفادکس LH-20 و HPLC استفاده شد. پس از لکه‌گذاری بر TLC و تعیین نسبت های مختلف از حلالها بر عصاره اتیل استاتی، در نهایت حلال هگزان جهت باز کردن ستون و آغاز جداسازی انتخاب شد. مقدار ۵/۸ گرم از عصاره اتیل استاتی در اتیل استات حل و به تدریج روی مقدار کمی سیلیکاژل لود شد. سیلیکاژل مسکور پس از خشک شدن به تدریج به سطح ستون منتقل گردید. شستشوی ستون با هگزان ، کلروفرم ، کلروفرم: اتیل استات (۵:۵)، اتیل استات و متانول ادامه یافت. (جدول ۲)

جدول ۱-۳- فراکسیون های حاصل از شستشوی ۵/۸ گرم عصاره بر روی ستون سیلیکاژل اولیه و حلال‌های بکار رفته در آن

نام فراکسیون	وزن فراکسیون(g)	شماره ارلن ها	نسبت حلالها
A	۰/۲۲۵	۱-۵	هگزان ۱۰۰٪
B	۱/۰۵	۶-۲۰	کلروفرم ۱۰۰٪
C	۰/۸۰۰	۲۱-۳۰	کلروفرم ۱۰۰٪
D	۲/۴۲۳	۳۱-۵۵	کلروفرم-اتیل استات (۵:۵)
E	۰/۶۱۳	۵۶-۶۰	اتیل استات
F	۰/۹۰۰	۶۱-...	متانول

۵ -۳- جدا سازی ترکیبات A'، B'، C'، D' و E' از فراکسیون اتیل استاتی *S. oligocystum*

فراکسیون C با وزن ۰/۸۰۰ گرم جهت ادامه کار انتخاب شد و بر روی ستون سیلیکاژل مش درشت به ترتیب با سیستم‌های حلال هگزان: کلروفرم: اتیل استات (۱۰:۹:۱)، کلروفرم: اتیل استات (۹:۱) شسته و شش فراکسیون C_1 تا C_6 حاصل شد. C_2 با وزن ۲۳۰ میلی‌گرم توسط ستون سیلیکاژل و حلال کلروفرم: اتیل استات (۹:۱) به چهار فراکسیون C_{21}، C_{22}، C_{23} و C_{24} تقسیم شد. از این میان فراکسیون C_{22} با وزن ۴۵ میلی گرم طی روند جداسازی خالص شد. سپس C_{23} با وزن ۸۰ میلی گرم جهت جداسازی با HPLC با سیستم حلال و برنامه زیر انتخاب گردید.

متانول	آب	سرعت جریان حلال $(mL/\min)$	زمان $(\min)$
۹۵	۵	۳	۰
۱۰۰	۰	۳	۱۵
۱۰۰	۰	۳	۵۰

پس از انجام HPLC دو فراکسیون C_{231} و C_{232} جدا گردید.

فراکسیون‌های C_{22}، C_{231}، C_{232} خالص شده طی روند جداسازی به‌ترتیب به‌عنوان ترکیبات A'، B'، C' نام‌گذاری شده و توسط روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفتند.

در ادامه فراکسیون C_4 با وزن ۷۷ میلی‌گرم انتخاب بر روی ستون سفادکس با حلال متانول قرار گرفت که منجر به ایجاد سه فراکسیون C_{41}، C_{42} و C_{43} شد، از فراکسیون C_{43} خالص شده طیف پروتون گرفته شد و مشخص شد که مشابه ترکیب A' می‌باشد. سپس فراکسیون C_{42} با وزن ۴۷ میلی‌گرم توسط HPLCبا سیستم حلال و برنامه زیر مورد جداسازی قرار گرفت و سه فراکسیون C_{421}، C_{422} و C_{423} حاصل شد که از این میان C_{422} با وزن ۷ میلی‌گرم خالص شد.

در ادامه فراکسیون C_5 با وزن ۱۴۹ میلی‌گرم جهت جداسازی بر روی ستون HPLCبا سیستم حلال و برنامه زیر قرار گرفت

متانول	آب	سرعت جریان حلال $(mL/\min)$	زمان $(\min)$
۹۵	۵	۴	۰
۹۵	۵	۴	۲۰
۱۰۰	۰	۴	۲۱
۱۰۰	۰	۴	۶۰

و دو فراکسیون C_{51} و C_{52} حاصل شد، سپس فراکسیون C_{52} با وزن ۷ میلی‌گرم جهت، خالص‌سازی بیشتر یک بار دیگر توسط HPLCو با برنامه و سیستم حلال زیر مورد جداسازی قرار گرفت.

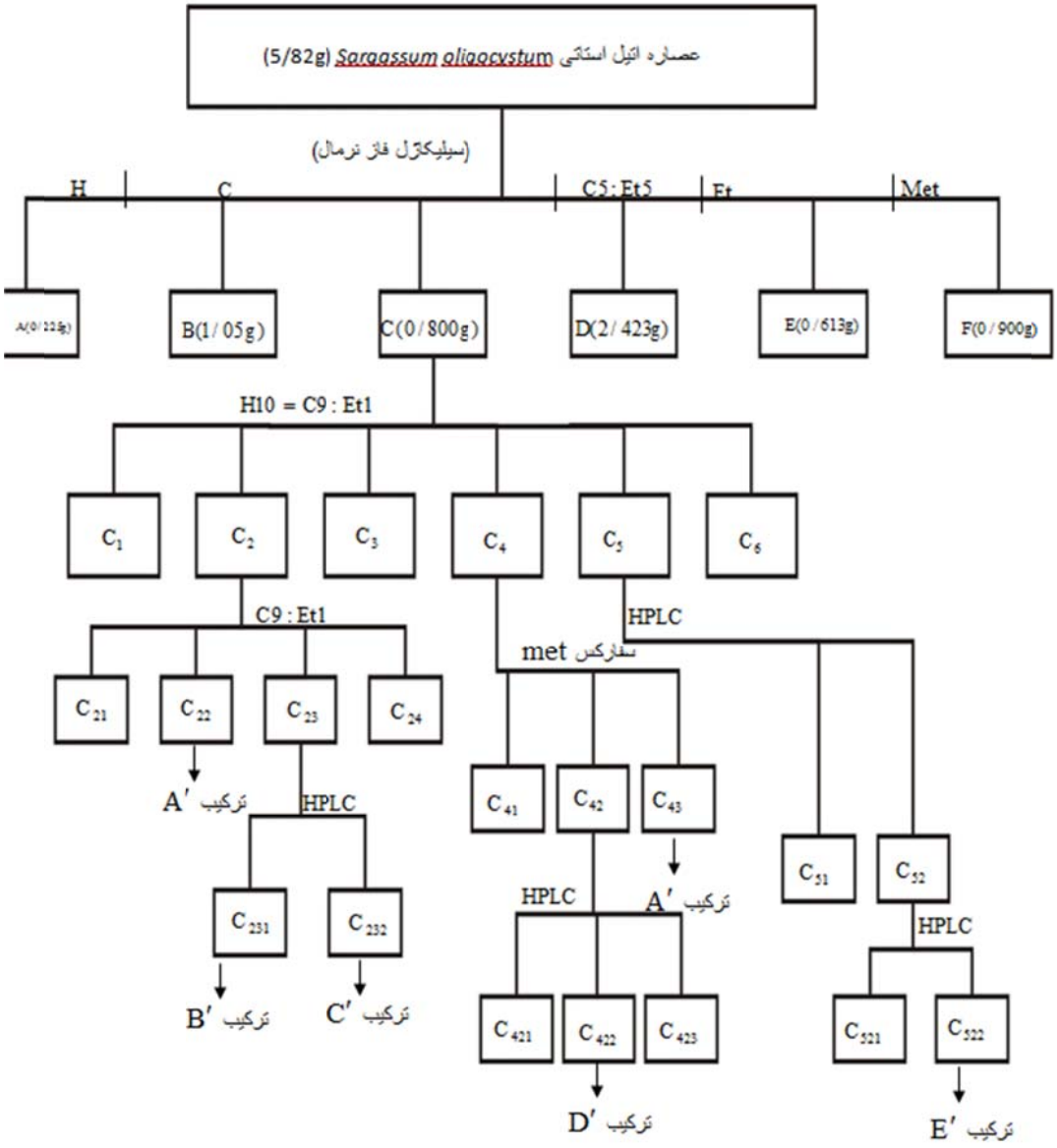
متانول	آب	سرعت جریان حلال $(mL/\min)$	زمان $(\min)$
۹۰	۱۰	۳	۰
۹۰	۱۰	۳	۴۰
۱۰۰	۰	۳	۴۱
۱۰۰	۰	۳	۶۰

و در نهایت دو فراکسیون C_{521}(۲میلی‌گرم) و C_{522}(۴میلی‌گرم) حاصل شد.

فراکسیون‌های C_{422} و C_{423} خالص شده طی روند جداسازی به ترتیب به‌عنوان ترکیب‌های D' و E' نام‌گذاری شده و توسط روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. ترکیب D'به دلیل وزن کم و عدم خلوص کافی شناسایی نشد ولیکن ترکیب E' مورد شناسایی قرار گرفت.

ن

مودار ۱-۳: طرحی کلی از روند استخراج ترکیبات از عصاره



۴-نتایج

۴-۱- بازدهی عملیات عصاره‌گیری

درصد عصاره‌های به‌دست آمده از جلبک قرمز *Gracilariopsis persica* با وزن خشک ۱۱۲۶ گرم و جلبک قهوه‌ای *Sargassum oligocystum* با وزن خشک در جدول زیر خلاصه شده است.

جدول ۴-۱- بازدهی عملیات عصاره‌گیری از جلبک *Gp-persica*

گونه جلبکی	درصد وزنی- وزنی عصاره خشک به قطعات جلبکی		
	عصاره اتیل استاتی	متانولی	آبی- متانولی (۱:۱)
Gp. persica	٪ ۰/۱۸	٪ ۴/۸۰	٪۱۲

جدول ۴-۲- بازدهی عملیات عصاره‌گیری از جلبک *S. oligocystym*

گونه جلبکی	درصد وزنی- وزنی عصاره خشک به قطعات جلبکی
	عصاره کلروفرم: متانول (۳:۱)
S.oligocystum	٪۱/۷۲

۴-۲- نتایج جداسازی

در این پژوهش علاوه بر پنج ترکیب استروئیدی ، تعدادی اسید چرب اعم از اشباع و غیر اشباع ، ترپن و یک ترکیب فنلی نیز خالص شده است اما در این بخش به گزارش نتایج مرتبط با ترکیباتی که تاکنون شناسایی شده، بسنده می شود.

- مشخصات ترکیبات A(A′)و B(B′)

الف: مشخصات ظاهری: کریستالهای سفید و پودری شکل

در TLC با فاز ثابت سیلیکاژل وفاز متحرک کلروفرم:اتیل استات(۹:۱) دارای R_f= ۰/۳۷ میباشد. ظهور لکه روی TLC با معرف انیس آلدئید و ایجادرنگ بنفش بوده است.

ب: مشخصات طیف $^{13}C-NMR$ و $^{1}H-NMR$ با حلال $CDCl_3$ با طیف سنج ۵۰۰ مگاهرتز در جدول ۴-۱ و۴-۲ مشخص شده است.

جدول ۳-۴- مشخصات طیف NMR جسمA

۷	۳۱/۹	
۸	۳۱/۹	
۹	۵۰/۱	
۱۰	۳۶/۵	
۱۱	۲۱/۱	
۱۲	۳۹/۸	
۱۳	۴۲/۳	
۱۴	۵۶/۸	
۱۵	۲۴/۷	
۱۶	۲۸/۲	
۱۷	۵۶/۱	
۱۸	۱۲/۰	۰/۶۸(s, 3H)
۱۹	۱۹/۳	۱/۰۰(s, 3H)
۲۰	۳۵/۸	
۲۱	۱۸/۷	۰/۹۱(d, J=6.5Hz, 3H)
۲۲	۳۶/۲	
۲۳	۲۳/۸	
۲۴	۳۹/۵	
۲۵	۲۸/۰	
۲۶	۲۲/۷	۰/۸۶(m, 3H)
۲۷	۲۲/۶	۰/۸۸(m, 3H)

جدول۴-۴-مشخصات طیف NMRجسم B

شماره کربن	C-NMR $\delta(ppm)$	H-NMR $\delta(ppm)$
۱	۳۷/۲	
۲	۳۱/۶	
۳	۷۱/۸	۳/۵۰ (m, 1H)
۴	۴۲/۲	
۵	۱۴۰/۷	
۶	۱۲۱/۷	۵/۳۰ (t,1H)
۷	۳۱/۹	
۸	۳۱/۹	
۹	۵۰/۱	
۱۰	۳۶/۵	
۱۱	۲۱/۱	
۱۲	۳۹/۷	
۱۳	۴۲/۲	
۱۴	۵۶/۸	
۱۵	۲۴/۷	
۱۶	۲۸/۲	
۱۷	۵۵/۹	
۱۸	۱۱/۸	۰/۶۹(*s*, 3H)
۱۹	۱۹/۳	۱/۰۰(*s*, 3H)
۲۰	۴۰/۱	
۲۱	۲۰/۸	۱/۰۰(*m*, 3H)
۲۲	۱۳۸/۱	۵/۱۸(*m*, 1H)
۲۳	۱۲۶/۲	۵/۲۱(*m*, 1H)
۲۴	۴۱/۹	
۲۵	۲۸/۶	
۲۶	۲۲/۳	۰/۸۶(*m*, 3H)
۲۷	۲۲/۲	۰/۸۸(*m*, 3H)

۳-۴- مشخصات جسم C′:

الف: مشخصات ظاهری: کریستالهای سفید محلول در کلروفرم.

درTLC با فاز ثابت سیلیکاژل و فاز متحرک کلروفرم:اتیل استات(۹:۱) با فاز ثابت سیلیکاژل و فاز متحرک کلروفرم:اتیل استات(۹:۱) دارای R_f= ۰/۵۲ میباشد .

ظهور لکه روی TLC با معرف انیس آلدئید و ایجاد رنگ بنفش بوده است.

ب: مشخصات طیف $^{13}C-NMR$ و $^{1}H-NMR$ باحلال $CDcl_3$ باطیف سنج ۵۰۰ مگاهرتز درجدول۳-۷ مشخص شده است.

جدول۵- ۴- مشخصات طیف NMR جسم C′

شماره کربن	C-NMR $\delta(ppm)$	H-NMR $\delta(ppm)$
۱	۳۷/۲	
۲	۳۱/۶	
۳	۷۱/۸	۳/54(m, 1H)
۴	۴۲/۲	
۵	۱۴۰/۷	
۶	۱۲۱/۷	۵/36 (m,1H)
۷	۳۱/8	
۸	۳۱/8	
۹	۵۰/۱	
۱۰	۳۶/۵	
۱۱	۲۱/0	
۱۲	۳۹/7	
۱۳	۴۲/۳	
۱۴	۵۶/7	
۱۵	۲۴/2	
۱۶	۲۸/۲	

ادامه جدول۵- ۴- مشخصات طیف NMR جسم'C

شماره کربن	C-NMR $\delta(ppm)$	H-NMR $\delta(ppm)$
۱۷	55/6	
۱۸	۱۲/۰	۰/۷۰(s, 3H)
۱۹	۱۹/۴	۱/۰۲(s, 3H)
۲۰	۳۶/۵	
۲۱	۱۸/۷	۰/۹۹(d, , 3H)
۲۲	۳۵/۲	
۲۳	۲۵/۶	
۲۴	۱۴۶/۹	
۲۵	۳۴/۷	
۲۶	۲۲/۱	۰/۹۹ (d, 3H)
۲۷	۲۲/۳	۰/۹۹ (d, 3H)
۲۸	۱۱۵/۵	
۲۹	۱۳/۱	۱/۵۸ (d, 3H)

۴-۴- مشخصات جسم E

الف:مشخصات ظاهری:کریستالهای سفید رنگ ومحلول در کلروفرم

در TLC بافاز ثابت سیلیکاژل وفاز متحرک کلروفرم:اتیل استات(۹:۱) دارایR_f=.۰/۴۷ میباشد. ظهور لکه روی TLC با معرف انیس آلدئید و ایجادرنگ آبی بوده است.

۵-۴- ارزیابی درصد عصاره های مختلف

با توجه به نتایج درصد عصاره های مختلف جلبک *Gracilariopsis persica* میزان عصاره اتیل استات نسبت به عصاره متانول-آب بسیار اندک بوده و این مطلب نشان دهنده این است که ترکیبات غیر قطبی در این جلبک نسبت به ترکیبات قطبی اندک می باشد. زیرا غالب ترکیبات جلبک ها پلی ساکاریدها، آگار وکاراجینان و ترکیبات قطبی دیگر می باشد که این ترکیبات بیشتر حجم جلبک را تشکیل می دهد. همچنین در مورد جلبک *Sargassum oligocystum* و *Nizimuddinia zanardini* نیز میزان اندک عصاره کلروفرم-متانول(۳:۱) به همان دلیل اشاره شده برمی گردد زیرا بیشتر حجم این جلبک را نیز انواع پلی ساکارید ها از جمله آلژینات تشکیل می دهد.

۶-۴ - تفسیر ترکیب A (A′)

با توجه به اینکه ترکیب **A** از جلبک *S. oligocystum* و *Nizimuddinia zanardini* و ترکیب A′ از جلبک *Gp. Persica* جداسازی و خالص گردید و نتایج طیف های NMR این دو ترکیب مشابه بود لذا این دو ترکیب مشابه میباشند.

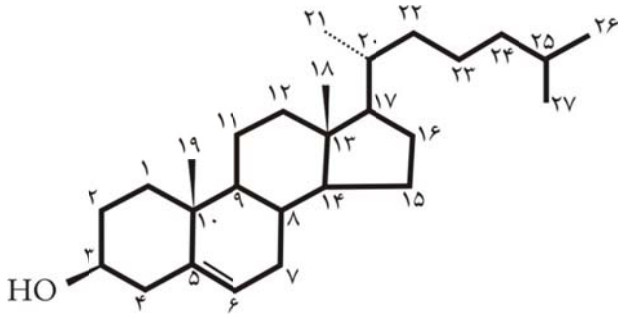
ترکیب فوق با معرف انیس آلدئید اسید سولفوریک پس از حرارت دادن ایجاد رنگ بنفش نموده است که می‌توان دلیلی بر وجود ترکیب احتمالی استروئیدی باشد. در بررسی طیف $^{1}H-NMR$ این ترکیب وجود پنج گروه متیل در موقعیت بین ۰/۶۸ ppm تا ۱/۰۰ ppm قابل مشاهده هستند. گروه متیلی که در بالاترین میدان ظاهر شده مربوط به متیل موقعیت هجده هسته سیکلو پنتانو پرهیدروفنانترن و گروه متیل ظاهر شده در پایین‌ترین میدان (۱/۰۰ ppm) مربوط به متیل موقعیت نوزده می‌باشد.

وجود پیک دو شاخه در ۰/۹۱ ppm با ثابت اثر اسپین (j)۶/۵ هرتز مربوط به گروه متیل موقعیت بیست و یک می‌باشد که به وسیله پروتون موقعیت بیست دو شاخه شده است. دو گروه متیل باقی مانده (۰/۸۶ ppm و ۰/۸۸ ppm) مربوط به گروه های متیل موقعیت بیست و شش و بیست و هفت بوده که به وسیله پروتون بیست و پنج هر کدام دو شاخه شده‌اند اما به دلیل هم‌پوشانی با یکدیگر به صورت چند شاخه در طیف مشاهده می‌شوند. پیک مربوط به پروتون موقعیت سه در هسته اصلی استروئیدی در ۳/۵۰ ppm ظاهر شده است. به دلیل اینکه کربن این پروتون حاوی یک گروه هیدروکسیل می‌باشد در میدان پایین‌تر نسبت به بقیه‌ی پروتون‌های آلیفاتیک قرار گرفته است. علاوه بر آن به دلیل مجاورت این پروتون با دو پروتون موقعیت دو و دو پروتون موقعیت چهار به صورت چند شاخه دیده می‌شود. در ناحیه مربوط به پیوند دو گانه (۵/۳ppm) وجود پروتون ناحیه شش که یک گروه الفینی می‌باشد به اثبات می‌رسد این پروتون بوسیله دو پروتون موجود در کربن مجاور(موقعیت هفت) سه شاخه شده است.

در بررسی طیف $^{13}C-NMR$ ترکیب A وجود بیست و شش پیک که نشانه وجود بیست و شش نوع کربن در ساختار این ترکیب است. با توجه به اینکه جا به جایی شیمیایی کربن‌های موقعیت هفت و هشت یکسان می‌باشد وجود بیست و هفت کربن در ساختار ترکیب تائید می‌شود. کربن موقعیت سه در این مولکول که متصل به گروه هیدروک‌سیل می‌باشد در میدان پایین و حدود ۷۱/۸ppm ظاهر شده است. کربن‌های پیوند دوگانه (موقعیت پنج و شش) به ترتیب در ۱۴۰/۷ ppm و ۱۲۱/۷ppm دیده می‌شود. پیک مربوط به کربن ناحیه پنج به دلیل اینکه کربن نوع چهارم می‌باشد از ارتفاع کمتری نسبت به پیک مربوط به کربن شماره شش برخوردار است. سه پیک مشاهده شده در حدود ۷۷ppm مربوط به حلال کلروفرم می‌باشد.

با توجه به یافته‌های $^{1}H-NMR$ و $^{13}C-NMR$ مشخص می‌شود که ترکیب A، ترکیب استروئیدی حاوی یک پیوند دو گانه و یک گروه هیدروکسیل و پنج گروه متیل می‌باشد با مقایسه اطلاعات بدست آمده از

طیف کربن و پروتون NMR و با توجه به منابع موجود ساختمان زیر با نام کلستورل برای این ترکیب به اثبات می‌رسد.(G oad, 1997)



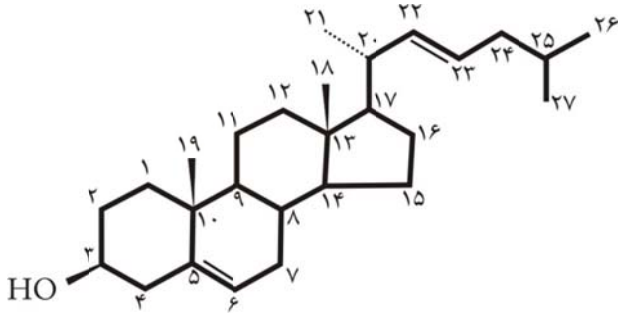
شکل ۱-۴- ساختمان مولکولی ترکیب کلسترول

۴-۷- تفسیر ترکیب B (B′)

بررسی طیف $^{1}H-NMR$ ترکیب B مشابه ترکیب قبل وجود پنج گروه متیل را نشان می‌دهد با این تفاوت که در این ترکیب متیل موقعیت بیست و یک به دلیل مجاورت با پیوند دو گانه در میدان پایین‌تری(عدد جا به جایی بزرگتر) نسبت به ترکیب قبل(کلسترول) وجود دارد. جا به جایی شیمیایی در مورد متیل شماره بیست و یک این ترکیب معادل ppm ۱/۰۰ در مقابل ppm ۰/۹۱ مربوط به کلسترول می‌باشد. جا به جایی شیمیایی بقیه گروه‌های متیل مشابه کلسترول است در طیف پرتون این ترکیب در ناحیه پیوند دو گانه وجود دو پیوند دو گانه محرز است. اولین پیوند دو گانه که مربوط به کربن‌های پنج و شش می‌باشد مشابه کلسترول بوده و در ppm ۵/۳۰ ظاهر شده است و دومین پیوند دوگانه در جا به جایی شیمیایی ppm ۵/۱۸ و ppm ۵/۲۱ ظاهر شده است که هر کدام مربوط به یک پروتون این پیوند دو گانه می‌باشد. با توجه به اینکه پیک مربوط به هر دو یاین پروتون‌ها چند شاخه بوده بنابراین این پیوند دوگانه در زنجیره جانبی قرار دارد. علاوه بر این مشابه کلسترول، پیک چند شاخه ظاهر شده در ppm ۳/۵۰ مربوط به پرتون کربن شماره سه که متصل به گروه هیدروکسیل است می‌باشد.

طیف $^{13}C-NMR$ این ترکیب وجود بیست و هفت پیک کربن را مشابه کلسترول نشان می‌دهد بنابراین ساختار شیمیایی این ترکیب حاوی بیست و پنج کربن می‌باشد. کربن موقعیت سه در این ترکیب استروئیدی به دلیل حضور گروه هیدروکسیل روی آن نسبت به بقیه‌ی کربن‌ها در میدان پایین‌تری ظاهر شده و در ppm ۷۱/۸ دیده می‌شود. در ناحیه مربوط به پیوند دوگانه در طیف کربن چهار پیک دیده می‌شود که مود ید وجود دو پیوند دوگانه در این ترکیب است. مشابه کلسترول پیک‌های pmm ۱۴۰/۷ و ppm ۱۲۱/۷ مربوط به پیوند دوگانه داخل حلقه B (کربن‌های پنج و شش) می‌باشد. علاوه بر آن پیوند دوگانه دیگری در موقعیت کربن‌های

بیست و دو و بیست و سه با جا به جایی شیمیایی ppm ۱۳۸/۱ و ppm ۱۲۶/۲ در این ترکیب مشخص است. مقایسه طیف کربن جسم فوق با منابع، نشان می‌دهد که ساختار شیمیای این ترکیب ۲۲- دهیدروکلستورل است(Goad, 1997) فرمول شیمیایی ۲۲- دهیدروکلسترول در زیر نشان داده شده است.



شکل ۲-۴: ساختمان مولکولی ترکیب ۲۲- دهیدروکلسترول

۸-۴- تفسیر ترکیب C′

در بررسی طیف $H-NMR$ ترکیب فوق وجود دو نوع پروتون پسوند دوگانه درناحیهٔ ppm ۱۸ / ۵ و ppm ۵/۳۶ مشخص می‌گردد. انتگرال هر دو نوع پروتون معادل یک می‌باشد. با توجه به اینکه پروتون با جابه جایی شیمیایی ppm ۵/۳۶ مشابه کلسترول و دهیدروکلسترول بوده مربوط به پروتون شش اسکلت استروئیدی است. پروتون دیگر(ppm ۵/۱۸) مربوط به یک پروتون پیوند دوگانه بوه که با توجه به انتگرال آن، طرف دیگر پیوند دوگانه یک کربن نوع چهارم است. جا به جایی شیمیایی ppm ۳/۵۴ نیز مربوط به پروتون، کربن ناحیه سه می‌باشد.(مشابه کلسترول و دهیدروکلسترول).

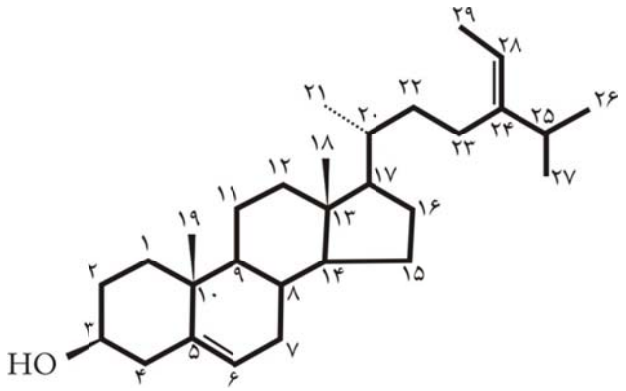
گروه‌های متیل ترکیب فوق در طیف پروتون از ppm ۰/۷۰ تا ppm ۲/۵۹ دیده می‌شوند. گروه متیل واقع در بالاترین میدان مشابه در ترکیب قبل مربوط به گروه متیل کربن شماره ۱۸ می‌باشد و گروه قبل ظاهر شده در پایین‌ترین میدان مربوطبه ۲۰ کربن ناحیه ۲۹ است. این گروه متیل به دلیل مجاورت با یک پیوند دو گانه در میدان پایین‌تر ظاهر شده همچنین به دلیل مجاورت با یک پروتون پیوند دوگانه بصورت دو شاخه در طیف دیده می‌شود.

در طیف $^{13}C-NMR$ این ترکیب وجود حداقل بیست و هشت نوع کربن با توجه به بیست و هشت پیک مشاهده شده در طیف مشخص می‌شود. غالباً به دلیل اینکه کربن شماره هفت و هشت در طیف استروئیدها جا به جایی شیمیایی یکسانی دارد، و این مسئله در طیف ترکیب مذکور و به صورت افزایش ارتفاع این پیک مشخص گردیده است. به همین دلیل ترکیب مذکور بیست و نه کربنه می‌باشد.

پیوند دوگانه موجود در هسته اصلی استروئیدی (کربن‌های پنج و شش در جا به جایی شیمیایی ۱۲۱/۷ppm، ۱۴۰/۷ppm) دیده می‌شود که به ترتیب مربوط به کربن شش و پنج می‌باشد پیوند دوگانه دیگر که مربوط بهزنجیر جانبی بوده در ۱۴۷/۰ ppm و ۱۱۵/۵ppm ظاهر شده که به تریب مربوط به کربن شماره بیست و چهار و بیست وهشت می‌باشد. ارتفاع کم بیک مربوط به کربن شماره بیست وچهار مؤید این مطلب است که این کربن نوع چهارم می‌باشد.

کربن موقعیت سوم به دلیل اتصال گروه هیدروکسیل و میدان پایین‌تر نسبت به کربن‌های مشابه قرار گرفته و در ۷۱ / ۸ppm ظاهر شده است.

با مقایسه طیف پروتون و کربن ترکیب حاضر با منابع مشخص می‌شود که این ترکیب فوکوسترول است(۱۹۹۷ و Good). که ساختار شیمیایی آن در زیر نشان داده شده است.



شکل ۳-۴: ساختمان مولکولی ترکیب فوکوسترول

۹-۴- تفسیر ترکیب E′

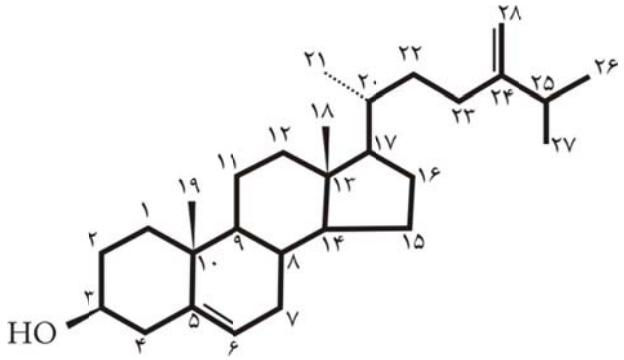
مقایسه طیف Mass ترکیب حاضر با منابع موجود مشخص می‌سازد که این ترکیب اوستراسترول(کالیناسترول) می‌باشد(۱۹۹۷، Goad).

پیک‌های اصلی طیف Mass آن به صورت زیر است:

۲۱۳ , ۲۲۹ , ۲۵۶ , ۲۷۱ , ۲۸۵ , ۲۸۷ , ۲۹۶ , ۲۹۹ , ۳۰۰ , ۳۱۴ , ۳۲۷ , ۳۶۵ , ۳۸۰ , ۳۸۴ , ۳۹۸

طیف پروتون و کربن این جسم ترکیب ساختمان اوستراسترول را تأیید می‌کند. که ساختار شیمیایی آن در زیر نشان داده شده

است.

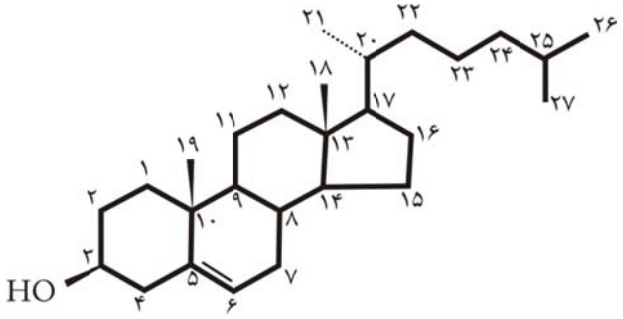


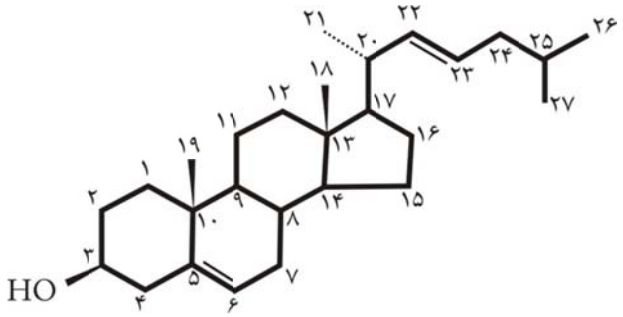
شکل ۴-۴: ساختمان مولکولی ترکیب اوستراسترول (کالیناسترول)

۴-۱۰- جدا سازی استروئیدها از پادینا

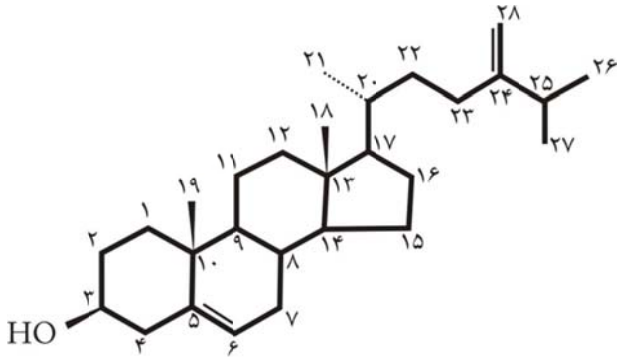
پس از عصاره گیری و ماتیتور کردن عصاره با کروماتوگرافی نازک لایه و تشخیص رنگ های بنفش و آبی که بیانگر حضور استروئید ها است . عصاره دکانته شده به دو فاز قطبی و غیر قطبی تقسیم شده سپس کروماتوگرافی بعدی بر روی ستون های سیلیکاژل مش درشت و مش ریز و سفادکس قرار گرفته ترکیبات خالص شدن و برای خالص سازی بیشتر از HPLC پریپرتیو استفاده شد تا درصد خلوص بالا تر رود سپس ترکیبات در حلال حل شده جهت گرفتن طیف از دستگاه nmr استفاده شد سپس با استاندارد ها مقایسه و شناسایی شد: پروتون با استاندارد تطبیق داده شد در برخی موارد نیز جحت اطمینان از طیف mass استفاده شد.

ساختار شیمیایی ترکیبات استخراجی:





شکل ۶-۴- ۲۲ دی هیدروکلسترول



شکل ۷-۴-کالیناسترول

۱۱-۴- جدا سازی استروئیدها از *Nizimuddinia zanardini*

کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی ستونی فاز معمولی و معکوس ، سفادکس و نیز کروماتوگرافی مایع تحت فشار بالا((HPLC)، 18 ماده از آن ها جدا و خالص شد. استرول های جدا سازی شده از این گونه عبارتند از:

24(E)-stigmasta-5,24(24′)-dien-3βol معروف به فوکسترول، مخلوطی از دو اپی مر:

24(R)-hydroperoxy-24-vinylcholestrol و24(S)-hydroperoxy-24-vinylcholestrol و همچنین مخلوطی از دو اپی مر: 24(R)-hydroxy-24-vinylcholestrol و 24(S)-hydroxy-24-vinylcholestrol

۱۲-۴- بحث و تفسیر نتایج حاصل از جداسازی ترکیبات موجود در هر سه جلبک مورد مطالعه*Gp.persica* و *S.oligocystum* و *Nizimuddinia zanardini* و *Padina boergesni*

جلبکهای دریایی گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی بهنام متابولیتهای ثانوی را تولید میکنند که توسط انسان به عنوان ترکیب دارویی مصرف می شوند .طبق برآوردهای صورت گرفته در سال های اخیر، ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی که شامل گیاهان دارویی و فرآورده های آن هاست، همواره با رشد قابل توجهی رو به افزایش بوده است .با توجه به اینکه بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت های ثانوی

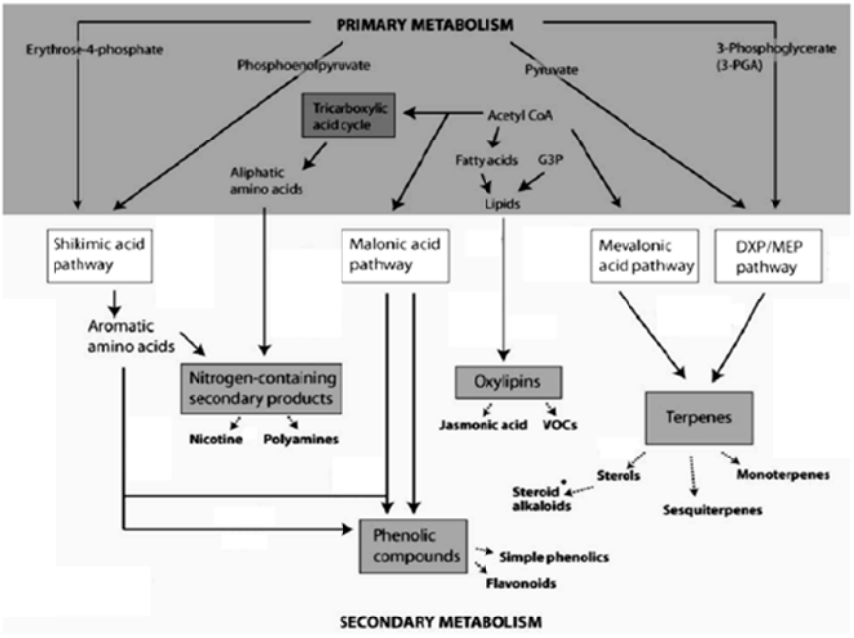
مشتق از این موجودات مربوط می شود، لذا متابولیت های ثانوی گیاهی از ارزش اقتصادی و همچنین ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند و سنتز شیمیایی این متابولیتها معمولا پیچیده و پرهزینه میباشد.

پیش ماده های ساختاری متابولیتهای ثانوی از متابولیت های اولیه حاصل میشوند .مسیرهای اصلی متابولیتهای ثانوی در گیاه و

ارتباط آنها با متابولیسم اولیه به صورت شماتیک در شکل زیر نشان داده شده است (Wink, 2010) . به استثنای فرایندهای اولیه بیوسنتز قند و آمینواسید، سه مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت های ثانوی شامل مسیرهای استات – مالونات، استات – موالونات و اسید شیکمیک میباشد (Dewick, 2002) .متابولیتهای ثانوی گیاهان معمولا بر اساس مسیر متابولیسمی آنها طبقهبندی می شوند .(Christen ,2000) معمولا متابولیتهای ثانوی در سه خانواده مولکولی بزرگ، گروه ترکیبات تیتروژن دار، ترپنها و فنولها در نظر گرفته می شوند (Bourgaud et al, 2001)

.گروههای مختلف متابولیتهای ثانوی، منابع و فعالیت های زیستی این ترکیبات در جدول 1 نشان داده شده است .

در.ساختمان بسیاری از متابولیت های ثانوی گیاهان، ازت و جود دارد.



شکل ۱: مسیرهای اصلی بیوسنتز متابولیتهای ثانوی و ارتباط آن‌ها با متابولیسم اولیه (Wink, 2010).

G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; VOC: Volatile Organic Compounds; 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate/1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway (MEP/DOXP pathway).

جدول ۱: گروههای مختلف متابولیت‌های ثانوی، منابع و عملکردهای زیستی آن‌ها (برگرفته از Sauvi, 2007)

گروه	واحد ساختمانی	منابع گیاهی	فعالیت زیستی
آلکالوئیدها	اسنات آمینواسید ترپنوئید کلسترول	گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها	منبع نیتروژن، سمیت‌زدا، بازدارنده، آللوشیمی
ترپنوئیدها	ایزوپرن	گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌های روده‌ای	ضد میکروبی
فلاونوئیدها	مالونیل COA سینامیل COA فنیل‌پروپانوئید	بازدانگان، نهاندانگان، خزه‌ها، باکتری‌ها، سرخس‌ها، جلبک‌ها	آنتی بیوتیک، رنگیزه جذب کننده نور
لیگنین	فنیل پروپانوئیدها	بازدانگان، نهاندانگان، سرخس‌ها	حفاظت ساختاری سد دفاعی
لیگنان ها	فنیل پروپانوئیدها	بازدانگان، نهاندانگان، سرخس‌ها	فیتوآلکسین، ضد قارچی، ضد میکروبی، ضد ویروسی

در مطالعه حاضر بررسی فیتوشیمیایی منجر به استخراج دو استروید به نام های کلسترول و ۲۲دی هیدرو کلسترول از هر دو جلبک مورد مطالعه *Gp.persica* و *S.oligocystum* گردید. همچنین در مطالعه ای که توسط هایممون و همکارانش در زمینه فیتوشیمیایی بر روی جلبک *G.foliifera* انجام شد منجر به جداسازی سه استروید: کلسترول و ۲۲دی هیدرو کلسترول و دموسترول شد(Hayeememon et al.,1999).

محققان زیادی حضور استرول ها را در جلبکهای دریایی شناسای اعلام نموده اند مشابه یافته های این پروژه فوکوسترول بعنوان استرول اصلی جلبکهای قهوه ای در چندین گزارش اعلام شده است (2003، etal Kamenarska.)

Kamenarska و همکاران در سال ۲۰۰۳ ، پانزده نوع استرول از جلبکهای قهوه ای دریای سیاه شناسایی نمودن که در فوکسترول، کلسترول و desmosterol، 24-methylenecholesterol که یافته های پروژه حاضر موارد اعلام شده را تایید می نماید.

در انجام این تحقیق از مخلوط حلال کلروفرم- متانول(۱-۳) جهت عصاره گیری *S.oligocystum* استفاده شد. سپس به دو فاز آبی و اتیل استاتی جهت جدا کردن ترکیبات قطبی و غیر قطبی دکانته شد. که این روش عصاره گیری مشابه روش هاییممون و همکارانش بود. (Hayeememon et al; 1996).

-در مطالعه حاضر جداسازی فوکوسترول از عصاره اتیل استاتی *S.oligocystum* طی مراحل کروماتوگرافی ستونی با فاز سیلیکاژل نرمال وHPLC انجام شد. همچنین در مطالعه ای که توسط یونسیل و همکارانش در جهت جداسازی فوکوسترول از جلبک دریایی *Pelvetia siliquosa* انجام شد از عصاره هگزان- متانول(۵-۱) و ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل استفاده شد. سپس اثر آنتی اکسیدانی و آنتی دیابتیک فوکوسترول استخراج

شده مورد بررسی قرار گرفت و اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی دیابتیک قابل توجهی از خود نشان داد. (Yeon sil et al.,2003)

یافته های گزارشات متعدد نشان میدهد استروله جزو ترکیبات اصلی جلبکهای قهو های هستند ولی منطقی بنظر میرسد که نوع این ترکیبات تحت شرایط محیطی در گونه اهای متعدد متفاوت باشد . این ترکیبات جزو متابولیتهای ثانویه محسوب میشوند و متابولیتهای ثانویه هر موجود زنده ای تحت تاثیر شرایط محیطی متغیر ویا به مشتقات مشابه تبدیل میشوند.

ایت پروژه برای اولین بار از گونه های مورد بررسی مشتقات استروئیدی را معرفی نومده است که جهت میزان سمیت و یا مقادیر قابل تبدیل به دارو باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

- سعید نیا سودابه، ۱۳۸۰. بررسی فیتوشیمیایی و ایمونولوژیک گونه بومادران طالقانی" Achillea talagonica.Bioss"،به راهنمایی دکتر نرگس یاسا ،دانشکده داروسازی ، دانشگاه تهران، .شماره پ-۵۱
- کیان مهر – هرمز دیار،۱۳۸۴. بیولوژی جلبک ها
- Anggadiredja J, Andyani R, Hayati, Muawanah (1997) Antioxidant activity of Sargassum polycystum (Phaeophyta) and Laurencia obtusa (Rhodophyta) from Seribu Islands. J Appl Phycol 9:477–479
- Athukorala Y, Lee KW, Song C, Ahn CB, Shin TS, Cha YJ, Shahidi F, Jeon YJ (2003) Potential antioxidant activity of marine red alga Grateloupia filicina extracts. J Food Lipids 10:251–265.
- Ballantine DL, Gerwick WH, Velez SM, Alexander E, Guevara P (1987) Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbe Caribbean marina algae. Hydrobiologia 151/152:463–469
- Bellorine A.M., et al.2008. *Gracilariopsis Mclachlanii* Sp. Nov. And Gracilariopsis Persica Sp. Nov. Of The Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyceae) From The Indian Ocean. Phycological Society of America.
- Boaden, P.J.S. (1995). The adventive seaweed *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt in Strangford Lough, Northern Ireland. *Irish Naturalist Journal, 25*, 111 - 113.
- Borgesen,F.1939.Marine algae from the Iranian Gulf. Danish scientific investigation in iran.part 1,94 p
- Bourgaud, F., Gravot, A., Miles, S. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci.; 161(5): 839–851.
- Cannell R. J. P. Algae as a source of biologically active products. *Pest. Sci.* 39: 147–153 (2006).
- Carballo J.L., Hernandez-Inda Z.L. and Perez P. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *B.M.C. Biotechnol.* 2: 17 (2002).
- Chavez P.I., Sanchez I.A. and Gonzalez F.A. Cytotoxicity correlations of Puerto Rican plants using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. *Pharmaceut. Biol.* 35: 222–226 (1997).
- Choo KS, Snoeijs P, Pedersen M (2004) Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae Cladophora glomerata and Enter Enteromorpha ahlneriana. J Exp Mar Biol Ecol 298:111–123
- Chopin T .Marine Biodivdersity Monitoring protocol for monitoring of seaweed.A report by the marine biodiversity monitoring committee to the ecological monitoring and assessment network of environment Canada.25p.
- Craigie JS and Wen ZC (1984) Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). *Can. J. Biot.* 62, 1665-70.
- Critchley, A.T., Farnham, W.F., & Morrell, S.L. (1983). A chronology of new European sites of attachment for the invasive brown alga, *Sargassum muticum*, 1973-1981. *Jouranl of the Marine Biological Association of UK, 63*, 799 - 811.
- Davyt D, Entz W, Fernandez R, Mariezcurrena R, Mombru AW, Saldaña J, Dominguez L, Coll J, Manta E (1998) A new indole derivative from the red alga Chondria atropurpurea. Isolation, Structure determination, and anthelmintic activity. J Nat Prod 61:1560–1563.
- Dewick PM. 2002. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. Second Edition, Wiley. 7: 121-140.
- Duran R, Zubia E, Ortega MJ, Salva J (1997) New diterpenoids from the alga Dictyota dichotoma. Tetrahedron 53:8675–8688.
- Fleury, B.G., Pereira, M.V.G., Da Silva, J.R.R., Kaisin, M., Teixeira, V.L., & Kelecom, A. (1994). Sterols from brazilian marine brown algae. *Phytochemistry, 37*, 1447-1449.
- Fenical W, Paul VJ (1984) Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae. Hydro Hydrobiologia116/117:135–140
- Finney D.1971. Probit analysis .university press.
- Freile-Pelegrin Y and Murano E (2004) Agars from threespecies of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula *Bioresource. Techonology*. 9, 295-302.
- Ganchevakamenarska, Z., Dimitrovadimitrova-konaklieva, S., Stefanov, K.L., & Popov, S.S. (2003). A comparative study on the sterol composition of some brown algae from the Black Sea. *Journal of the Serbian Chemical Society, 68*: 269-275.
- Ghisalberi E .L.1993. Detection and isolation of bioactive natural products .Boca Raton, CRC Press
- Goad L.J; Alkihisa T.1997. Analysis of sterol ,Blackie academic and prophessional,London.
- Gohari, A.R., Saeidnia, S., Hadjiakhoondi, A., & Honda, G. (2008). Isolation and Identification of Four Sterols from Oud. *Journal of Medicinal Plants, 7*: 47-55.
- Gohari A.R., Hadjiakhoondi A., Sadat-Ebrahimi S.E., Saeidnia S. and Shafiee A. Cytotoxic triterpenoids from *Satureja macrantha* C.A. Mey. *Daru* 13: 177–181 (2005).

- Grundy S.M. ; et al .1969. the interaction of cholesterol absorption and cholesterol synthesis in man.J Lipid Res.

- Kamenarska, Z.G., Konaklieva, S. D., Stefanov, K. L., Popov, S. S.. 2003. A comparative study on the sterol composition of some brown algae from the Black Sea**.** *J.Serb.Chem.Soc. 68*(4–5)269–275.
- Kurata, K., Taniguchi, K., Shiraishi, K., & Suzuki, M. (1990). A C_{26} sterol from the brown algae *Eisenia bicyclis*. *Phytochemistry, 29*(11), 3678-3680.
- Le Tutour B, Benslimane F, Gouleau MP, Gouygou JP, Saadan B, Quemeneur F (1998) Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, Laminaria digitata, Himanthalia elongata, Fucus vesiculosus, Fucus serratus and Ascophyllum nodosum. J Appl Phycol 10:121–129
- 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
- Mazumder S., Ghosal P.K., and Pujol C.A. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* 31: 87–95 (2002).
- Mclaughlin J .L ; et al. 1991 . the discovery of bioactive natural products . Elsevire.
- Michael A. S; et al.1956 . *Artemina salina* as test organism for a bioassay . Science.
- Mohanan P . V; et al .1998 .Cytotoxicity of extracts of solanum trilobatum and anti- carcinogentic activity of sobatum .Biomedicine
- Mongelli E ; et al .1996 . Screening of Argentin medicinal plants using the Brine shrimp microvewell cytotoxicity assay . INT .J.Pharmacognosy.
- Mori J, Matsunaga T, Takahashi S, Hasegawa C, Saito H (2003) Inhibitory activity on lipid peroxidation of extracts from marine brown alga. Phytother Res 17:549–551
- Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, Tanaka R (1996) Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga Eisenia bicyclis. Fish Sci 62:923–926
- Padmini, P.; Sreenivasa, R.A.O. (1998). Biological investigations of Indian from frozen samples of *Sargassum johnstonii* Setehell et Gardner. *Seaweed Research and Utilisation, 20* (1,2), 91- 95.
- Park, D.W., Jo, Q., Lim, H.J., Veron, B., 2002. Sterol composition of dark grown Isochrysis galbana and its implication in the seed production of pacific oyster, Crassostrea gigas. J. Appl. Phycol. 14, 351–355.
- Park PJ, Heo SJ, Park EJ, Kim SK, Byun HG, Jeon BT, Jeon YJ (2005) Reactive oxygen effect of enzymatic extracts from Sargassum thunbergii. J Agric Food Chem 53:6666–6672
- Peterson G .L ; et al. 1980. Improved purification of Brine shrimp (Artemia salina) (Na=++K+)- activated adenosine triphostates and aminoacid and carbohydrate analyses of the isolated subnits.Biomchem J.
- Pisutthanan S., Plianbangchang P. and Pisutthanan N. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in family Meliaceae. *Naresuan Univ. J.* 12: 13–18 (2004).
- Rizvi M.A. and Mustafa S. Biological activity and elementology of benthic algae from Karachi coast. *Pak. J. Botany* 35: 717–729 (2003).
- Saeidnia, S, Gohari, A.R., Shahverdi, A.R., Permeh, P., Nasiri, M., Mollazade, K., et al. (2009). Biological activity of two red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf. *Pharmacognosy Research*, *1*(6), 428-430.
- Santoso J, Yoshie-Stark Y, Suzuki T (2004) Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. Fish Sci 70:183–188
- Sheu, L., Wang, G., Sung, P., Chiu, Y., & Duh, C. (1997). Cytotoxic sterols from the Formosan brown algae *Turbinaria ornate Planta medica 63-571.572.*
- Schaeffer, D.J., Krylov, V.S., 2000. Anti-HIVactivity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 208–227.
- Siddqiui S., Naqvi S.S., Usmanghani K. and Shameel S. Antibacterial activity and fatty acid composition of the extract from *H. musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Pak. J. Pharm. Sci.* 6: 45–51 (1993)
- Soeda S, Sakaguchi S, Shimeno H, Nagamatsu A (1992) Fibrinolytic and coagulant activities of highly sulfated fucoi Fibrinolytic and coagulant activities of highly sulfated fucoidan. Biochem Pharmacol 43(8):1853–1858
- Sun Y., Xu Y. and Liu K. Gracilarioside and gracilamides from the red alga Gracilaria asiatica. *J. Nat. Prod.* 69: 1488–91 (2006).
- Takaku T, Kimura Y, Okuda H (2001) Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its mechanism of action. J Nutr 131:1409–1413

- Wachter, G.A., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Hoffmann, J.J., Maiese, W.M., & Timmermann, B.M. (2001). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Growth by Saringosterol from *Lessonia nigrescens.journal of Natural* Product*,64(11),1463-1464.*
- Wang, P., Xu, G., Blan, L., Zhang, S., & Song, F. (2006). Study on sterols from. brown algae (*Sargassum muticum*). *Chinese Sciences Bulletin, 51*, 2520-2528.
- West, J., 2001. Agarophytes and carrageenophytes. In: Leet, W.S., Dewees, C. M., Klingbeil, R., Larson, E.J. (Eds.), California's Living Marine Resource: A Status Report, California, pp. 286–287.
- Wink, M. 2010. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. second edition. Inc. New Delhi, India.: 20-30.
- Wynne MJ (2005) A checklist of benthic marine algae of the tropical andsubtropical western Atlantic: second revision. Nova HewigiaBeih 129:1–152
- Yeonsil L ; et al .2003 .Antioxidant activities of Fucosterol from the Marine alge *Pelvetia siliquosa.* Arc Pharm Res .
- Yeonsil L ; et al .2004.Anti diabetic activites of Fucosterol from Marine alge *Pelvetia Siliquosa. Arc Pharm Res*
- Zandi K., Salimi M. and Sartavi K. *In vitro* Antiviral Activity of the Red Marine Alga from Persian Gulf, *Gracilaria salicornia*, Against Herpes Simplex Virus Type 2. *J. Biol. Sci.* 7: 1274–1277 (2007).
- Zhou, G.F., Xin, H., Sheng, W., Sun, Y., Li, Z., Xu, Z., 2005. In vivo growth inhibition of S180 tumor by mixture of 5-Fu and low molecular lambda carrageenan from Chondrus ocellatus. Pharmacol. Res. 51, 153–157.

Abstract

Padina boergesenii is one of the most abundant brown algae distributed in the north of Persian Gulf and Oman Sea. In this study after sampling and preparation of *Padina boergesenii* by Chroform-Etanol (3-1) solvent and by Methanol has been extract. Separation and purification of the compounds was carried out using thin layer, general and inverse column chromatography, Cephadex and high-performance liquid chromatography (HPLC). Structural elucidation of the constituents was based on the data obtained from H-NMR, ^{13}C-NMR, HSQC, HMBC, DEPT and Cephadex LH-20. The steroids compounds separated from above alga were identified as 22-dehydrocholesterol (1), cholesterol (2), fucosterol (3), *β*-sitosterol (4), stigmasterol (5), ostreasterol (6) and two epimer of hyroxyestrol(7), based on their spectral data and from comparison with those previously reported in the literature.

Keywords: Brown Algae, *Padina boergesenii* ،Steroids compounds, Oman Sea

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Off-Shore Fisheries Research Center

---

Project Title : Extraction, Purification, Identification and amount verification of Steroids, in *Sargassum glaucescens and Padina boergesni* algae in Oman sea
Approved Number: 2-78-12-89180
Author: Shahla Jamili
Project Researcher : Shahla Jamili
Collaborator(s) :S. Saeidnia, M. Nasiri, P. Parmeh, Gharanjik, M. Nazemi, S. Jadgal, G.M. Sopak, M. Sadrian
Advisor(s): A.R. Gohari kakhaki
Supervisor: M.R. Hosseini
Location of execution : Sistan-O-Balouchestan province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 2 Years & 6 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute

Project Title :

Extraction, Purification, Identification and amount verification of Steroids, in *Sargassum glaucescens and Padina boergesni* algae in Oman Sea

Project Researcher :

Shahla Jamili

Register NO.

48454