

مقایسه عصاره‌های اسپیرولینا (آرتروسیپرا) و کلرلا از نظر میزان جذب اشعه ماوراءبنفش و اثر آنتی‌اکسیدانی

فاطمه نجفلی^۱ (M.Sc)، طاهره حسین‌آبادی^۲ (Ph.D)، مریم تبرزد^{۳*} (Ph.D)

۱- گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه و فن آوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

۲- گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- گروه بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات فن آوری پروتئین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱

m_tabarzad@sbmu.ac.ir

۰۲۱۸۸۶۴۸۱۲۴ تلفن: *

چکیده

هدف: ریزجلبک‌ها به عنوان منبع خوبی از ترکیبات محافظتی در برابر تابش ماوراءبنفش، مانند اسیدهای آمینه شبه مایکوسپورین (MAAs)، کاروتنوئیدها و پلی‌فنل‌ها مورد تأیید قرار گرفته‌اند. اسپیرولینا (آرتروسیپرا) و کلرلا در بازار مراقبت از پوست به عنوان محصولات طبیعی قابل دسترس مورد توجه می‌باشند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از پودر خشک ریزجلبک‌های کلرلا و لگاریس و آرتروسیپرا پلاتنسیس، عصاره‌های مختلف تهیه شد. تخلیص نسبی ترکیبات MAA انجام شد. ترکیبات استخراجی با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و طیف‌سنجی جرمی بررسی و میزان جذب اشعه (UV) Ultraviolet نمونه‌ها در محدوده UV-A (۴۰۰-۳۱۵ nm) و UV-B (۲۸۰-۳۱۵ nm) با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. میزان تام پروتئین موجود در عصاره‌ها و اثر آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: در نمونه‌های استخراج شده با متانول درصد بالاتری از ترکیباتی با ویژگی‌های مشابه با اسیدآمینه‌های شبه مایکوسپورینی مشاهده شد که اثر آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای نیز داشتند. در طیف‌سنجی جرمی، دو پیک عمده با جرم مولکولی معادل ۳۴۴ m/z و ۸۸۷ شناسایی شدند. نمونه‌های استخراج شده از هر دو ریزجلبک با متانول ۵۰ و ۱۰۰٪ تعداد بیش‌تری از ترکیبات دارای جذب در محدوده UV-A و UV-B نشان دادند. به‌طور کلی، استخراج ترکیبات جاذب UV از ریزجلبک کلرلا و لگاریس و آرتروسیپرا پلاتنسیس با متانول بازده را افزایش داد. نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات متفاوت ترکیبات استخراجی در نمونه‌های مختلف استفاده هم‌زمان از آن‌ها به عنوان ترکیبات طبیعی در تهیه فراورده‌های ضد آفتاب می‌تواند در دستیابی به یک فراورده کارآمد مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اشعه ماوراءبنفش، ریزجلبک، آرتروسیپرا پلاتنسیس، کلرلا و لگاریس

مقدمه

(Species, ROS) بکاهند [۲]. انواع موجودات زنده از جمله پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها قادرند با تولید ترکیبات جاذب اشعه ماوراء بنفش از خود در برابر اشعه مضر UV محافظت کنند [۳]. استفاده از عصاره‌های استخراجی از منابع گیاهی در کاهش آسیب ناشی از تابش‌های مختلف، مانند اثر حفاظت پرتویی عصاره چای سبز در برابر تابش پرتوهای گاما [۴] گزارش شده است.

جلبک‌ها طیف وسیعی از موجودات را از گروه‌های مختلف فیلوژنتیک با حدود سی هزار گونه تشکیل می‌دهند. به طور کلی، این دسته از ارگانسیم‌ها به دو گروه درشت‌جلبک پرسلولی و ریزجلبک تک‌سلولی (جلبک‌های میکروسکوپی)

تابش فرابنفش، بخشی از طیف الکترومغناطیس خورشید با بازه ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر می‌باشد که عامل محیطی خطرناک برای موجودات زنده در نظر گرفته می‌شود [۱]. با توجه به اثرات جانبی احتمالی استفاده از ضدآفتاب‌های فیزیکی و شیمیایی، می‌توان از عصاره‌های گیاهی به عنوان جاذب پرتوهای (UV) Ultraviolet در تولید فراورده‌های ضدآفتاب طبیعی استفاده و از مشکلات ناشی از ضدآفتاب‌های شیمیایی پیشگیری کرد. پرتوهای خورشید به خصوص UVB قادرند از عمر سلول‌های اساسی بدن از جمله پوست، به طور مستقیم و یا با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen)

تعداد زیادی از ریزجلبک‌های سبز-آبی جداسازی شده از منابع دریایی، خشکی یا آب تازه حاوی MAAها می‌باشند. اولین گزارش مربوط به تجمع مقادیر زیادی از MAAها در سیانوباکتر *Microcoleus* در سال ۱۹۶۹ بود. فردی به نام Shibata متوجه شد که عصاره سیانوباکتر در ناحیه فرابنفش باند جذبی پر قدرتی در طول موج ۳۲۲ نانومتر از خود نشان می‌دهد [۱۱]. این ترکیبات دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه نیتروژن‌دار، با وزن ملکولی پایین و کم‌تر از ۴۰۰ دالتون و محلول در آب هستند که توسط موجودات متنوعی به ویژه آن‌ها که در زیست بوم‌های دارای تابش شدید نور خورشید مانند دریا زندگی می‌کنند، تولید می‌شوند. خصوصیت بسیار قابل توجه اسیدآمین‌های شبه مایکوسپورینی توانایی این ترکیبات در جذب تابش فرابنفش در محدوده آسیب‌رسان از طول موج ۳۰۹-۳۶۲ نانومتر می‌باشد که آن‌ها را به عنوان ترکیبات ضدآفتاب مورد توجه قرار داده است [۱۲].

سنتز اسیدآمین‌های شبه مایکوسپورینی با نور UV، به خصوص UV-B به دلیل داشتن انرژی بالاتر نسبت به UV-A، افزایش می‌یابد. تابش UV تولید ROS را افزایش می‌دهد که خود باعث تحریک ژن‌های تولیدکننده ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شده و بیان این ترکیبات را افزایش می‌دهد [۴۸]. از دیگر عملکردهای اسیدآمین‌های شبه مایکوسپورینی می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی، مقابله با فشار اسمزی، فشار خشکی و گرما اشاره کرد [۱۳]. این خانواده شامل ۳۰ عضو، از جمله مایکوسپورین گلیسین (MGly)، پالیتین، پالیتینول، ستیرین ۳۳۰، پورفیرا ۳۳۴، شینورین و ... است که بیش‌ترین فراوانی آن‌ها در گونه‌های ریزجلبکی است [۱۴].

در دسترس بودن تجاری MAAها هنوز بسیار محدود است. موانع موجود در تجاری‌سازی آن‌ها شامل دسترسی فصلی محدود به برخی مواد خام، به ویژه جلبک‌های دریایی و هزینه‌های بالای برداشت و غلظت سلولی پایین منابع، مانند ریزجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها است. علاوه بر این، روش‌های استخراج و خالص‌سازی فعلی برای MAAها اغلب به استفاده از حلال‌ها و همچنین سانتریفیوژ، تبخیر و سایر فرآیندهای پرهزینه نیاز دارند. سنتز شیمیایی این ترکیبات دشوار است، و تولید هترولوگ با استفاده از باکتری و مخمر هنوز در حال توسعه است و برای تولید تجاری در دسترس نیست. بنابراین، تکنیک‌های جدید استخراج مانند فیلتراسیون غشایی راه حلی برای استخراج MAA از منابع در دسترس با هزینه کم است و می‌تواند به پر کردن شکاف موجود در بازار در توسعه فرمول‌های ضد آفتاب طبیعی کمک کند [۱۵].

طبقه‌بندی می‌شوند [۵]. استراتژی‌های مختلف مقاومت در برابر UV، اولین بار در سیانوباکتری‌ها کشف شد که از جمله آن‌ها ترکیبات جاذب UV مثل آمینواسیدهای شبه مایکوسپورینی (Mycosporine-like amino acids, MAAs) و کاروتنوئیدها در پوشش بیرونی سیانوباکتری‌ها است. اکثر سیانوباکتری‌ها در مکانیسم‌های تعمیر DNA، کارآمدی بالایی دارند [۶،۷].

استفاده از ریزجلبک‌های سبز-آبی به عنوان منبع تولید ترکیبات فعال زیستی نسبت به دیگر منابع دارای مزایایی می‌باشد؛ از جمله این‌که می‌توان آن‌ها را در تمام طول سال کشت داد، استراتژی‌های تطابقی سریعی دارند و به همین دلیل می‌توانند در محیط‌های خشن دما زیاد یا کم، pH بالا یا پایین، غلظت نمکی زیاد، خشکی زنده بمانند، رشد سریعی دارند، متابولیت‌های ثانویه متعدد مفیدی تولید می‌کنند، کشت آن‌ها هیچ پیامد منفی بر امنیت غذایی و زیستی منطقه ندارد. بنابراین، برای مصارف صنعتی بسیار با اهمیت هستند [۸].

چندین محصول مراقبت از پوست موجود در بازار جهت مصارف انسانی حاوی ریزجلبک‌ها هستند. به عنوان مثال، شرکت Soliance از یک گونه کامل *Arthrospira* استفاده می‌کند و یا محصولات مراقبت از پوست مشتق از گونه کلرلا وجود دارد. همچنین، اسید آلوگورونیک یکی دیگر از مواد تشکیل‌دهنده محصولات مراقبت از پوست ضد پیری تهیه شده از ریزجلبک‌ها است که توسط شرکت Solazyme تولید می‌شود. تولید فرمولاسیون‌های کارآمد و مطمئن با هزینه ارزان‌تر با استفاده از عصاره اسپیرولینا یا کلرلا در فرمولاسیون‌های آرایشی و بهداشتی امکان‌پذیر است. لوازم آرایشی ساخته شده از ریزجلبک‌ها می‌توانند جایگزین محصولات شیمیایی موجود شوند. ضمن آن که برای محیط زیست بی‌خطر هستند. سازمان غذا و داروی آمریکا

(U.S. Food and Drug Administration, FDA) عصاره آرتروسپیرا را به عنوان یک ماده "ایمن" تایید کرده است. البته تحقیقات بیشتری برای شناسایی و تأیید تمام اثرات فارماکولوژیک این دسته از عصاره‌ها ضروری است [۹]. عملکردهای آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد تئوپلاستیک، کاهش چربی خون، ضد ویروسی، تعدیل‌کننده ایمنی، ضد میکروبی، ضد آرتروزیک، ضد دیابت و محافظت در برابر تابش اشعه برای اسپیرولینا مطرح شده است. علاوه بر این، تأثیر مثبت اسپیرولینا بر چندین اندام از جمله مو، پوست، کبد، سیستم عصبی مرکزی، ریه و دستگاه ادراری تناسلی گزارش شده است [۱۰].

مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق، در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. منحنی استاندارد رسم و نمونه‌های مجهول بر اساس آن تعیین مقدار شد. به دلیل رنگ نمونه‌ها، رقت‌سازی اولیه از هر نمونه تهیه شد. نمونه‌ها به صورت سه بار تکرار بررسی شدند.

تخلیص بیش‌تر برای خلوص نسبی MAA ها، عصاره‌های استخراجی درون بشرهای مجزا ریخته و به مدت ۲۴ ساعت زیر هود خشک شد. سپس، نمونه‌ها بسته به میزان انحلال در ۱ تا ۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند، به صورتی که محلول شفاف ایجاد شود. برخی نمونه‌ها که انحلال کم‌تری نشان دادند، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به یک میلی‌لیتر از هر نمونه، ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و به شدت ورتکس و سپس، با دور ۱۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. لایه رویی که محیط آبی و حاوی عصاره مورد نظر است با دقت به میکروتیوبی جدید و تمیز منتقل شد. در نهایت، نمونه‌ها توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون فیلتر شدند.

بررسی میزان MAA به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC. آنالیز نمونه‌ها توسط دستگاه HPLC مجهز به آشکارساز Photo diode array detector (PDA) انجام شد. آنالیز بر روی نمونه‌های با تخلیص نسبی MAA و فیلتر شده انجام شد. ۱۰۰ μL از نمونه‌ها به ستون C₁₈ با ابعاد ۲۵×۴/۶ mm و قطر تخلخل ۵ μL تزریق شد. ستون با فاز متحرک شامل مخلوطی از استیک اسید ۰/۲٪، متانول و استونیتریل با نسبت حجمی به ترتیب ۱۰:۱۰:۸۰ با سرعت جریان ۱ mL.min⁻¹ شست‌وشو داده شد. طول موج شناسایی روی ۳۳۰nm و طول موج اسکن PDA بین ۲۰۰nm تا ۸۰۰nm و مدت زمان هر آنالیز ۱۵ دقیقه تنظیم شد. طیف UV نمونه‌ها جهت شناسایی پیک مواد دارای بیشینه جذب بین ۳۰۰-۴۰۰ نانومتر و سطح زیر منحنی پیک‌ها به عنوان معیاری از میزان و درصد استخراج MAA بررسی و آنالیز شد.

بررسی طیف سنجی جرمی نمونه نسبتاً خالص MAA. برای انجام آنالیز LC/MASS محصول استخراجی، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه LC (Agilent 1200 series) دارای ستون (C₁₈) با فاز متحرک مشابه روش HPLC تزریق و آنالیز با کمک روش طیف‌سنجی جرمی (دستگاه Agilent Triple Quad 6410 انجام شد. آنالیز به صورت یونیزاسیون مثبت اجرا و ثبت کروماتوگرام نمونه با کمک شناساگر طیف سنجی فرابنفش (UV detector) و جذب در طول موج ۳۲۰ نانومتر انجام شد.

برای دستیابی به منبع مناسبی از ترکیبات جاذب UV، در این تحقیق بر آن شدیم تا عصاره‌های هیدروالکلی مختلف استخراجی از گونه اسپیرولینا (آرتروسپیرا) پلاتنسیس و کلرلا و لگاریس را از نظر توانایی جذب تابش ماوراءبنفش و اثر آنتی‌اکسیدانی به منظور توسعه یک محصول ضدآفتاب کارآمد مقایسه کنیم. حلال مورد استفاده در استخراج MAA ها، یک حلال قطبی است که عموماً از آب و متانول برای این منظور استفاده می‌شود [۱۶]. در این مطالعه از حلال‌های آلی متفاوت با درصدهای مختلف استفاده شد تا اثر استفاده از سیستم‌های حلال متفاوت در استخراج از ریزجلبک‌ها بر تغییر در ترکیبات یا درصد ترکیبات استخراجی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

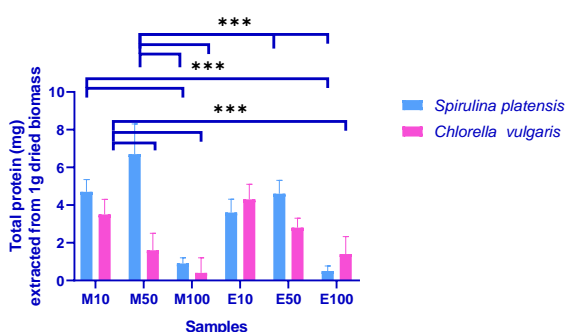
مواد و ارگانسیم‌ها. مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه با درجه خلوص شیمیایی analytical grade از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. پودر خشک ریزجلبک آرتروسپیرا پلاتنسیس از بانک ریزجلبکی فارس تهیه شد. ریزجلبک کلرلا و لگاریس در آزمایشگاه کشت داده شد و پس از ۲۵ روز، توده زیستی جدا و به روش لیوفیلیزاسیون خشک شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد IR.SBMU.PHARMACY.REC.1401.176 به تأیید رسیده است.

تهیه عصاره با حلال‌های متفاوت. تهیه عصاره دو ریزجلبک آرتروسپیرا پلاتنسیس و کلرلا و لگاریس از نمونه پودر آن‌ها با روش استخراج با حلال آلی انجام شد. حلال‌های مورد استفاده شامل اتانول و متانول ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰٪ بود. در دو سری مجزا، ۱ گرم از پودر هر نمونه جلبک توزین و ۵۰ میلی‌لیتر از هر کدام از حلال‌های ذکر شده به نمونه‌ها افزوده شد. سپس، نمونه‌ها با کمک هم‌زن مغناطیسی به خوبی مخلوط شده و در نهایت، با کمک دستگاه هم‌زن‌ایزر اولتراسونیک با قدرت ۲۰۰ وات به مدت ۲۰ دقیقه استخراج انجام شد. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط بر روی شیکر اوربیتال تحت اختلاط با دور ۲۰۰rpm قرار گرفتند. در مرحله آخر، نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰g و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جدا و با کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر گردید.

بررسی میزان تام پروتئین به روش برادفورد. غلظت تام پروتئین در محلول‌های استخراج‌شده، توسط تست برادفورد به کمک کیت مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها (استاندارد و تست) با ۱ میلی‌لیتر از معرف برادفورد

جدول ۱- غلظت تام پروتئین در عصاره های مختلف اسپیرولینا پلاتنسیس (آرتروسپیرا پلاتنسیس) و کلرلا ولگاریس استخراج شده با درصدهای مختلف حلال متانولی و اتانولی

ریزجلبک	حلال	مقدار کل پروتئین استخراجی (mg)
کلرلا ولگاریس	متانول ۱۰٪	۴/۷ ± ۰/۶۵
	متانول ۵۰٪	۶/۷ ± ۱/۶
	متانول ۱۰۰٪	۰/۹ ± ۰/۳
	اتانول ۱۰٪	۳/۶ ± ۰/۷۱
	اتانول ۵۰٪	۴/۶ ± ۰/۷۱
آرتروسپیرا پلاتنسیس	متانول ۱۰٪	۰/۵ ± ۰/۳۷
	متانول ۵۰٪	۳/۵ ± ۰/۸
	متانول ۱۰۰٪	۱/۶ ± ۰/۹
	اتانول ۱۰٪	۰/۴ ± ۰/۰۸
	اتانول ۵۰٪	۴/۳ ± ۰/۸
	اتانول ۱۰۰٪	۲/۸ ± ۰/۵
	اتانول ۱۰۰٪	۱/۴ ± ۰/۹۳



شکل ۱. مقایسه غلظت تام پروتئین در عصاره های مختلف اسپیرولینا پلاتنسیس (آرتروسپیرا پلاتنسیس) و کلرلا ولگاریس استخراج شده با درصدهای مختلف حلال متانولی (M) و اتانولی (E)، اعداد نشان دهنده درصد اتانول یا متانول در آب است. *** نشان دهنده p-value ≤ 0.0001 است.

نتایج میزان MAA نمونه‌های استخراجی. میزان اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورینی استخراج شده در نمونه‌ها به روش HPLC فاز معکوس بر روی ستون C₁₈ آنالیز و نتایج بررسی طیف‌ها در جدول ۲ گزارش شده است.

درصد MAA استخراجی با توجه به سطح زیر منحنی پیک‌های دارای جذب در ۳۳۰ nm در مقایسه با سطح زیر منحنی کل پیک‌های مشاهده شده در طیف به دست آمد. با توجه به تفاوت ماهیت کلرلا و اسپیرولینا، حلال‌های مشابه نتایج مختلفی را ایجاد کردند. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، بیش‌ترین درصد MAA استخراجی در کلرلا با حلال اتانول ۱٪ و اسپیرولینا با متانول ۱۰٪ مشاهده شده است. زمان بازداری ترکیبات اصلی استخراج شده در طیف، در محدوده ۳-۴ min است که با توجه به ماهیت قطبی ترکیبات MAA مورد انتظار بود.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی محصول و استخراج با تست DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil) جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌ها از تست DPPH استفاده شد. با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه الایزا شفاف، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های متفاوت از عصاره‌ها با حجم مساوی از محلول متانولی DPPH ترکیب شدند. از متانول و DPPH به عنوان کنترل منفی و از محلول آسکوربیک اسید (با غلظت ۱٪) و DPPH برای کنترل مثبت استفاده و برای هر عصاره یک بلانک فاقد محلول DPPH در نظر گرفته شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی کامل انکوبه و سپس میکروپلیت توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۱۷ نانومتر بررسی شد. فعالیت مهارتی رادیکال‌ها توسط ترکیب DPPH با فرمول زیر اندازه‌گیری می‌شود. در این فرمول Ac نشان‌دهنده جذب کنترل آزمایش (DPPH) و At نشان‌دهنده جذب نمونه و Ab نشان‌دهنده جذب بلانک می‌باشد.

$$\text{antioxidant effect} = \frac{1 - (At - Ab)}{Ac} \times 100$$

آنالیز آماری

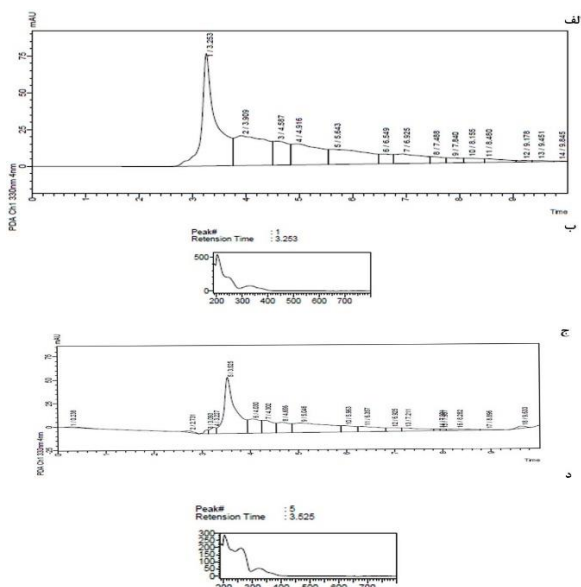
بررسی نمونه‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. نتایج توسط نرم‌افزار Excel 2016 آنالیز و به صورت Mean±SD محاسبه شد. مقایسه میانگین غلظت پروتئین و اثر آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف با روش تحلیل واریانس ANOVA و پس از آزمون توکی در نرم‌افزار IBM SPSS 21 انجام شد. $P \leq 0.05$ نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار است. نمودارها به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism7 رسم شد.

نتایج

میزان تام پروتئین‌ها در کلرلا ولگاریس و آرتروسپیرا پلاتنسیس. مقدار پروتئین موجود در نمونه‌های استخراجی به روش برادفورد بررسی شد. تعیین مقدار پروتئین موجود در عصاره پیش از حذف پروتئین‌ها با کلروفرم انجام و بر اساس نمودار کالیبراسیون تهیه شده برای غلظت‌های استاندارد آلبومین سرم گاوی محاسبه شد (جدول ۱). بیش‌ترین مقدار پروتئین در عصاره استخراج شده با نمونه‌های حاوی حداقل ۵۰٪ آب مشاهده شد.

مقایسه میزان پروتئین موجود در عصاره استخراجی نشان داد که اتانول و متانول ۵۰٪ بیش‌ترین میزان پروتئین را از توده زیستی آرتروسپیرا پلاتنسیس و کلرلا ولگاریس استخراج کرده‌اند.

ناحیه ۳۰۰-۴۰۰ nm بود که به ترتیب، در زمان بازداری ۳/۲۵۳ و ۳/۵۲۵ دقیقه مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج HPLC محصول استخراج MAA از نمونه استخراجی گونه اسپیرولینا (آرتروسپیرا) پلاتنسیس با حلال آلی متانول ۱۰ و ۱۰۰ درصد؛ الف: کروماتوگرام محصول استخراجی با متانول ۱۰٪؛ ب: طیف جذب UV پیک اصلی نمونه ۱۰٪؛ ترکیب اصلی در زمان بازداری ۳/۲۵۳ دقیقه دارای بیشینه جذب در ۳۳۰ nm است؛ ج: کروماتوگرام محصول استخراجی با متانول ۱۰٪؛ ب: طیف جذب UV پیک اصلی نمونه ۱۰٪؛ ترکیب اصلی در زمان بازداری ۳/۵۲۵ دقیقه دارای بیشینه جذب در ۳۳۰ nm است.

آنالیز HPLC محصول تخلیص نسبی MAAها *Chlorella vulgaris* استخراج با اتانول در درصدهای مختلف ترکیبات شاخصی با جذب بیشینه ۳۰۰-۴۰۰ nm نشان نداد. در نمونه اتانول ۱۰٪ پیک شاخص تقریباً هیچ جذب بیشینه‌ای در محدوده ۳۰۰-۴۰۰ nm نشان نداد. اما، ترکیب اصلی در نمونه‌های ۵۰ و ۱۰۰٪ جذب اندکی نشان دادند (شکل ۴).

در نمونه‌های استخراج شده با متانول، نیز متانول ۱۰٪ بازده خوبی نشان نداد. اما، متانول ۵۰ و ۱۰۰٪ دارای ترکیباتی با بیشینه جذب در ناحیه ۳۰۰-۴۰۰ nm بودند (شکل ۵).

آنالیز LC-MS محصول تخلیص نسبی MMAها از کلرلا و لگاریس و آرتروسپیرا پلاتنسیس

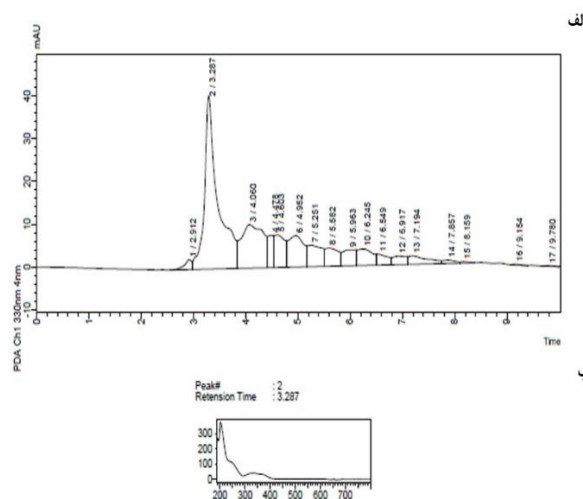
با توجه به نتایج، محصول تخلیص نسبی MAA از نمونه *Chlorella vulgaris* و نمونه *Spirulina platensis* با حلال‌های آلی متانول ۱۰٪ توسط دستگاه MS-LC نیز بررسی شد (شکل ۶).

جرم شاخص با m/z ۳۴۴/۵ $[M+1]^+$ در هر دو نمونه کلرلا و آرتروسپیرا مشاهده شد. با توجه به این‌که اکثر MAAهای گزارش شده تاکنون، دارای وزن مولکولی در

جدول ۲. نتایج آنالیز HPLC عصاره‌های مختلف اسپیرولینا پلاتنسیس (آرتروسپیرا پلاتنسیس) و کلرلا و لگاریس استخراج شده با درصدهای مختلف حلال متانولی و اتانولی

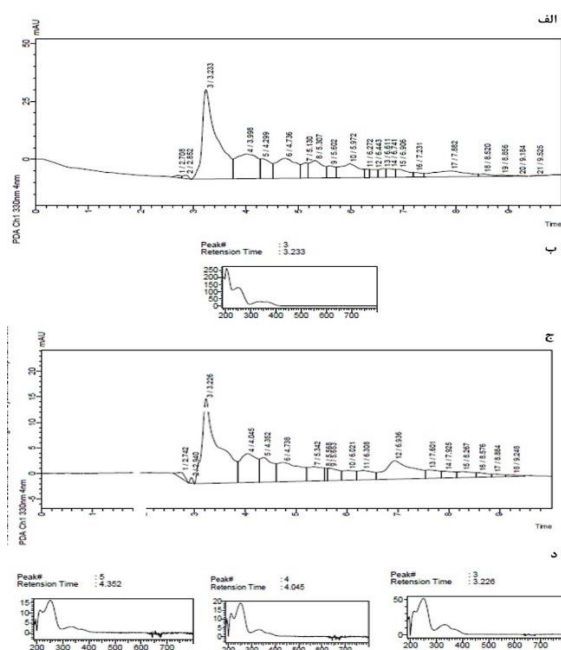
ریز جلبک	نمونه استخراجی	زمان بازداری پیک اصلی یا ماکزیمم جذب در ۳۳۰ nm (دقیقه)	درصد پیک اصلی
آرتروسپیرا پلاتنسیس	اتانول ۱۰٪	۳/۱۸۶	۳۲
	اتانول ۵۰٪	۳/۲۸۷	۴۰
	اتانول ۱۰۰٪	۳/۲۴۸	۴۳/۵
	متانول ۱۰٪	۳/۲۵۳	۴۶
	متانول ۵۰٪	۳/۵۱۲	۴۱
متانول ۱۰۰٪	۳/۵۲۵	۴۰	
کلرلا و لگاریس	اتانول ۱۰٪	۳/۵۱۹	۲۸
	اتانول ۵۰٪	۳/۴۸۲	۳۰
	اتانول ۱۰۰٪	۳/۵۷۴	۳۳
	متانول ۱۰٪	۳/۶۵۳	۲۵/۵
	متانول ۵۰٪	۳/۲۳۳	۳۲/۵
متانول ۱۰۰٪	۳/۲۲۶	۳۰	
مخلوط آرتروسپیرا و کلرلا	متانول ۵۰٪	۳/۲۱۰ و ۳/۵۱۲	۲۲ و ۲۵
	متانول ۱۰۰٪	۳/۴۹۰ و ۳/۹۹۲	۳۶ و ۱۴

آنالیز HPLC محصول تخلیص نسبی MAAها *Spirulina platensis* در میان نمونه‌های استخراج شده با اتانول، فقط نمونه اتانول ۵۰٪ دارای ترکیبی با بیشینه جذب در ناحیه ۳۰۰-۴۰۰ nm بود که در زمان بازداری ۳/۲۸۷ دقیقه مشاهده شد (شکل ۲).

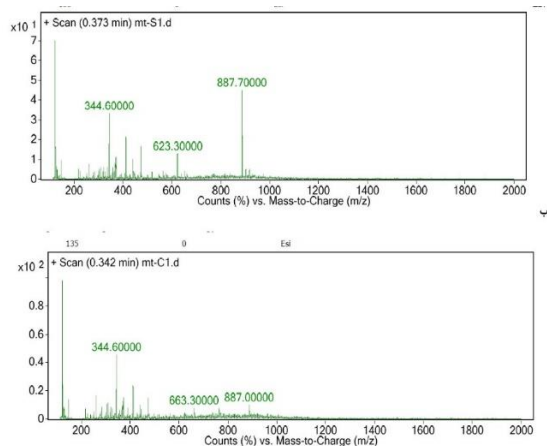


شکل ۲- نتایج HPLC محصول استخراج MAA از نمونه استخراجی گونه اسپیرولینا (آرتروسپیرا) پلاتنسیس با حلال آلی اتانول ۵۰ درصد؛ الف: کروماتوگرام محصول استخراجی؛ ب: طیف جذب UV پیک اصلی، ترکیب اصلی در زمان بازداری ۳/۲۸۷ دقیقه دارای بیشینه جذب در ۳۳۰ nm است.

در نمونه‌های استخراج شده با درصدهای متفاوت متانول، نمونه‌های ۱۰ و ۱۰۰٪ دارای ترکیباتی با بیشینه جذب در



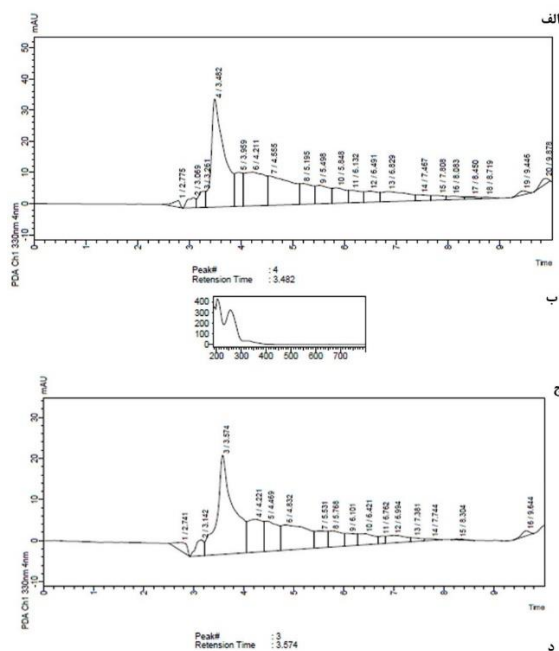
شکل ۵- نتایج HPLC محصول استخراج MAA از نمونه استخراجی گونه کلرلا ولگاریس با حلال آلی متانول ۵۰ و ۱۰۰ درصد؛ الف: کروماتوگرام محصول استخراجی با متانول ۵۰٪؛ ب: طیف جذب UV پیک اصلی نمونه ۱۰٪، ترکیب اصلی در زمان بازداری ۳/۲۳۳ دقیقه دارای بیشینه جذب در ۳۳۰ nm است؛ ج: کروماتوگرام محصول استخراجی با متانول ۱۰۰٪؛ ب: طیف جذب UV پیک اصلی نمونه ۱۰۰٪، ترکیب اصلی در زمان بازداری ۳/۲۲۶ دقیقه دارای بیشینه جذب در ۳۳۰ nm است. پیک‌های با زمان بازداری ۴/۳۵۲ و ۴/۳۵۲ دقیقه نیز بیشینه جذب در ۳۳۰ nm نشان دادند.



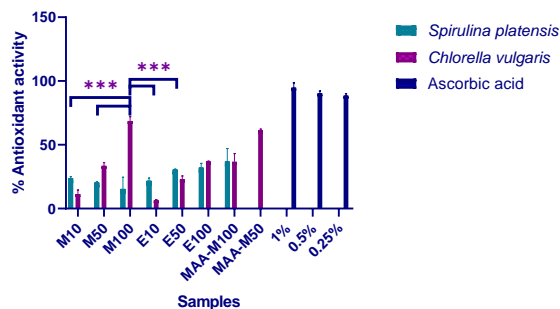
شکل ۶- کروماتوگرام LC-MS محصول استخراج MAA از نمونه (الف) و نمونه *Arthrospira platensis* (ب) با متانول ۱۰۰ درصد.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آرتروسپیرا پلانسیس و کلرلا ولگاریس. برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این تحقیق از روش DPPH استفاده شد. همه اندازه‌گیری‌ها سه بار تکرار و میانگین آن‌ها ثبت گردید. DPPH (دیفنیل- پیکریل- هیدرازیل) یک رادیکال آزاد ناپایدار است که می‌تواند یک الکترون یا رادیکال هیدروژن دریافت کند و به حالت پایدار درآید. به علت وجود الکترون

محدوده ۲۰۰ تا ۴۰۰ دالتون هستند، پیک ۳۴۴ شناسایی شده می‌تواند شاخص آمینو اسید شبه مایکوسپورینی گلايسین- والین باشد. در طیف جرمی نمونه آرتروسپیرا جرم شاخص دیگری با m/z ۸۸۷/۶ مشاهده شد که احتمال می‌رود ترکیباتی دارای جرم مولکولی بالا که با شدت کمی در طیف مشاهده می‌شوند، استخلافی از MAAها باشد که نیاز به بررسی ساختاری بیشتری برای شناسایی دقیق دارند. مشتقات گلیکوزیده MAAها با وزن مولکولی بالا بین ۸۰۰ تا ۱۵۰۰ دالتون گزارش شده‌اند.

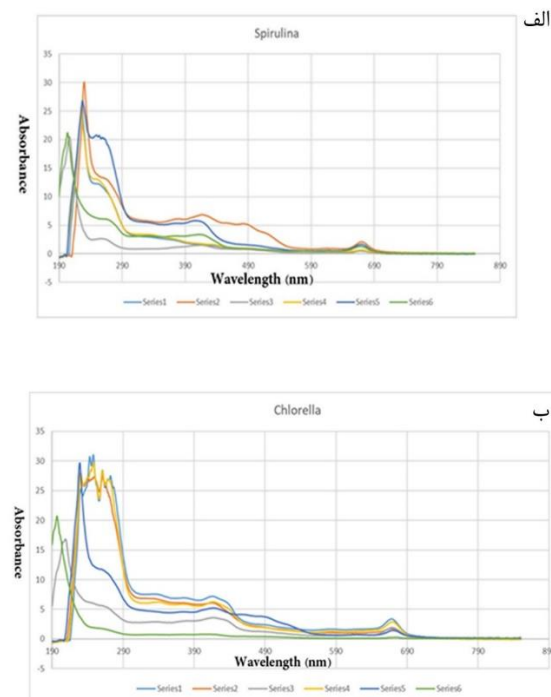


شکل ۴. بررسی HPLC محصول استخراج MAA از نمونه استخراجی گونه کلرلا ولگاریس با حلال آلی اتانول ۵۰ و ۱۰۰ درصد؛ الف: کروماتوگرام محصول استخراجی با اتانول ۵۰٪؛ ب: طیف جذب UV پیک اصلی نمونه ۱۰٪، ترکیب اصلی در زمان بازداری ۳/۴۸۲ دقیقه دارای بیشینه جذب در ۳۳۰ nm است؛ ج: کروماتوگرام محصول استخراجی با اتانول ۱۰۰٪؛ ب: طیف جذب UV پیک اصلی نمونه ۱۰۰٪، ترکیب اصلی در زمان بازداری ۳/۵۷۴ دقیقه دارای بیشینه جذب در ۳۳۰ nm است.



شکل ۷. مقایسه درصد فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف اسپیرولینا پلاتنسیس (آرتروسپیرا پلاتنسیس) و کلرلا ولگاریس استخراج شده با درصدهای مختلف حلال متانولی (M) و اتانولی (E)، اعداد نشان دهنده درصد اتانول یا متانول در آب است. *** نشان دهنده p-value ≤ 0.0001 است. آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت بررسی شد.

بررسی میزان جذب UV-A و UV-B عصاره ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتری. نتایج میزان جذب اشعه UV-A در محدوده (۳۲۰-۴۰۰ nm) و اشعه UV-B در محدوده (۲۹۰-۳۲۰ nm) نمودارهای طیف UV این عصاره ها در شکل ۹ مشاهده می شود (شکل ۸).



شکل ۸- طیف جذب UV در ناحیه ۸۰۰-۱۹۰ nm عصاره های اتانولی و متانولی اسپیرولینا (آرتروسپیرا پلاتنسیس) (آبی ۱- اتانولی ۱۰٪، نارنجی ۲- اتانولی ۵۰٪، طوسی ۳- اتانولی ۱۰۰٪، زرد ۴- متانولی ۱۰٪، سرمه ای ۵- متانولی ۵۰٪ و سبز ۶- متانولی ۱۰۰٪)؛ ب) عصاره های اتانولی و متانولی کلرلا ولگاریس (آبی ۱- اتانولی ۱۰٪، نارنجی ۲- اتانولی ۵۰٪، طوسی ۳- اتانولی ۱۰۰٪، زرد ۴- متانولی ۱۰٪، سرمه ای ۵- متانولی ۵۰٪ و سبز ۶- متانولی ۱۰۰٪).

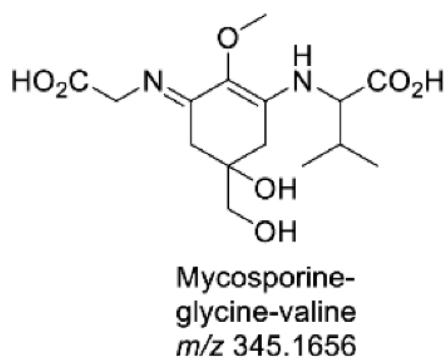
منفرد در ساختمان DPPH. این رادیکال در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارای جذب بیشینه می باشد و هر گاه در حضور یک ترکیب آنتی اکسیدانی با فعالیت پاک سازی رادیکال آزاد قرار گیرد، رنگ آن به سمت محدوده زرد و بی رنگ تغییر می یابد و کاهش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر، بیانی از فعالیت آنتی اکسیدانی خواهد بود [۱۷].

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با روش احیای رادیکال آزاد DPPH عصاره های آرتروسپیرا پلاتنسیس و کلرلا ولگاریس در حلال های آلی مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است. در بین نمونه های آزمایش شده با حلال های متفاوت، نمونه کلرلا ولگاریس استخراج شده با متانول ۱۰۰٪ بدون تخلیص نسبی MAA و متانول ۵۰٪ پس از تخلیص نسبی MAA، به ترتیب بیش ترین اثر آنتی اکسیدانی را نشان دادند. آسکوربیک اسید ۱٪ در آب به عنوان کنترل مثبت، اثر آنتی اکسیدانی حدود ۹۴٪ نشان داد.

جدول ۳. درصد فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف اسپیرولینا پلاتنسیس (آرتروسپیرا پلاتنسیس) و کلرلا ولگاریس استخراج شده با درصدهای مختلف حلال متانولی و اتانولی بررسی شده با روش DPPH

نمونه	حلال استخراجی	درصد آنتی اکسیدانی
آرتروسپیرا پلاتنسیس	متانول ۱۰٪	۲۳/۷ ± ۱/۴
	متانول ۵۰٪	۲۰/۴ ± ۰/۶۸
	متانول ۱۰۰٪	۱۵/۴ ± ۹/۲
	متانول ۱۰۰٪ (نمونه تخلیص نسبی MAA در آب)	۳۶/۸ ± ۱۰/۲
	اتانول ۱۰٪	۲۱/۸۴ ± ۲/۰۴
	اتانول ۵۰٪	۳۰/۵۹ ± ۰/۰۴
کلرلا ولگاریس	اتانول ۱۰۰٪	۳۲/۰۳ ± ۳/۴
	متانول ۱۰٪	۱۱/۴ ± ۳/۱
	متانول ۵۰٪	۳۳/۵ ± ۲/۰۵
	متانول ۱۰۰٪	۶۸/۷ ± ۳/۴
	متانول ۵۰٪ (نمونه تخلیص نسبی MAA در آب)	۶۱/۰۴ ± ۰/۹
	متانول ۱۰۰٪ (نمونه تخلیص نسبی MAA در آب)	۳۶/۷ ± ۶/۳۴
کنترل مثبت	اتانول ۱۰٪	۶/۶ ± ۰/۴
	اتانول ۵۰٪	۲۲/۹ ± ۲/۷
	اتانول ۱۰۰٪	۳۶/۹ ± ۰/۳۴
	آسکوربیک اسید ۱٪	۹۴/۷۹ ± ۳/۸
	آسکوربیک اسید ۰/۵٪	۹۰/۲۹ ± ۱/۹
	آسکوربیک اسید ۰/۲۵٪	۸۸/۵۹ ± ۱/۰۵

مقایسه اثر آنتی اکسیدانی میان گروه های مختلف (شکل ۷) نشان داد که تفاوت اثر آنتی اکسیدانی عصاره متانولی کلرلا ولگاریس با متانول ۱۰۰٪ اختلاف آماری معنی داری با سایر محصولات استخراجی دارد ($p\text{-value} < 0.0001$). نمونه تخلیص نسبی MAA از عصاره متانولی کلرلا ولگاریس با متانول ۵۰٪ نیز بیش ترین اثر آنتی اکسیدانی را نشان داد.



شکل ۹- ساختار شیمیایی و جرم مولکولی اسید آمینه شبه مایکوسپورینی گلیسین-والین

جدول ۴- مجموع جذب در ناحیه UVA و UVB در عصاره‌های مختلف اسپیرولینا پلاتنسیس (آرتروسپیرا پلاتنسیس) و کلرلا ولگاریس استخراج شده با درصد‌های مختلف حلال متانولی و اتانولی

نمونه‌ها	حلال استخراج	UV A	UV B
		محدوده جذب 290-320 (nm)	محدوده جذب 320-400 (nm)
<i>Arthrospira platensis</i>	Ethanol 10%	۲۱۵/۳۹۶	۴۰۱/۶۱۴
	Ethanol 50%	۳۹۹/۶۷۶	۹۳۶/۶۱
	Ethanol 100%	۵۴/۴۴۴	۱۶۸/۴۰۵
	Methanol 10%	۲۲۶/۷۰۱	۴۴۶/۹۶۲
	Methanol 50%	۳۹۰/۹۴۷	۸۶۶/۰۷۴
	Methanol 100%	۷۰۱/۶۷۵	۱۲۷۱/۵۸۶
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ethanol 10%	۵۴۲/۵۵۴	۱۱۳۵/۲۳۴
	Ethanol 50%	۴۸۴/۶۸۵	۱۰۰۹/۷۷۵
	Ethanol 100%	۱۷۵/۲۱۷	۴۷۳/۶۸
	Methanol 10%	۴۴۱/۶۳۵	۹۴۸/۹۵۳
	Methanol 50%	۳۲۵/۵۶۹	۷۳۵/۷۵۷
	Methanol 100%	۴۳/۱۷۴	۱۱۴/۹۵۸

همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود بالاترین میزان جذب در ناحیه UV-A و UV-B مربوط به عصاره آرتروسپیرا پلاتنسیس استخراج شده با متانول ۱۰۰٪ است. در میان عصاره‌های کلرلا ولگاریس، استخراج با اتانول ۱۰٪ نتایج بهتری را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از منابع طبیعی در تهیه محصولات موضعی دارویی جهت ترمیم آسیب‌های پوستی [۱۸] و همچنین، محصولات آرایشی و بهداشتی مانند ضد آفتاب‌ها مورد توجه ویژه‌ای قرار دارد [۱۹]. تابش فرابنفش (UVR) بخشی از طیف الکترومغناطیسی خورشیدی با طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر است. بر اساس خواص فیزیکی و فعالیت بیولوژیکی، UVB به سه باند تقسیم می‌شود: UV-A (۳۲۰-۴۰۰ نانومتر)، UV-B (۲۸۰-۳۲۰ نانومتر) و UV-C (۲۰۰-۲۸۰ نانومتر). با این

وجود، UVR که به سطح زمین می‌رسد تنها بخش کوچکی از کل UVR منتشر شده از خورشید را نشان می‌دهد و عمدتاً از طول موج‌های بالای ۲۹۰ نانومتر (UV-A) با یک جزء کوچک (تا ۱۰٪) از UV-B تشکیل شده است. بخش باقی‌مانده با طول موج کوتاه از طیف UV-B (۹۰٪) و کل طیف UV-C معمولاً به استراتوسفر زمین نفوذ نمی‌کنند و توسط لایه ازن جذب می‌شوند. اشعه ماوراء بنفش رسیده به زمین به عنوان اصلی‌ترین عامل مضر محیطی برای موجودات زنده در نظر گرفته می‌شود. UVR به طیف گسترده‌ای از سیستم‌های بیولوژیکی آسیب می‌رساند زیرا امواج کوتاه با فرکانس‌های بالا بسیار پرانرژی هستند. علاوه بر این، از اواخر دهه ۱۹۷۰، کاهش تدریجی ازن و تغییرات در نفوذپذیری آن مشاهده شده است و این تغییرات به افزایش قابل توجه میزان UV-B در سطح زمین کمک کرده است [۲۰].

قرار گرفتن پوست انسان به طور مداوم در معرض اشعه ماوراء بنفش مضر (UVR)، باعث ایجاد تعدادی از اختلالات حاد و مزمن می‌شود. امروزه، از آن‌جا که استفاده از برخی فیلترهای شیمیایی بحث‌های زیادی را برانگیخته است، تحقیقات بر روی کشف ترکیبات طبیعی جاذب UV طبیعی، کاملاً ایمن و بسیار کارآمد که می‌توانند به عنوان مواد فعال در محصولات مراقبت از آفتاب استفاده شوند، تمرکز دارد. یک جایگزین امیدوارکننده، استفاده از اسیدهای آمینه چند عملکردی شبه مایکوسپورینی (MAAs) است که می‌تواند به طور مؤثر با فیلترهای تجاری موجود رقابت کند. اخیراً اسیدهای آمینه شبه مایکوسپورین توجه تحقیقاتی فزاینده‌ای را به خود جلب کرده‌اند. آن‌ها متعلق به خانواده‌ای از متابولیت‌های ثانویه هستند که توسط طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌های مختلف تولید می‌شوند، به ویژه آن‌هایی که در اکوسیستم‌هایی با غلظت بالای نور خورشید زندگی می‌کنند، مانند محیط‌های دریایی و آب شیرین. تاریخچه تحقیقات در مورد MAAها به اواخر دهه ۶۰ قرن گذشته برمی‌گردد. از زمان کشف MAAها، دانش‌های مرتبط به آن‌ها از جمله اطلاعات در مورد ساختار، خواص، عملکرد و توزیع آن‌ها به طور مداوم در حال توسعه است [۱]. اسیدآمینه‌های شبه مایکوسپورینی، بیومولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین و محلول در آب هستند، که نور UV را در محدوده ۳۶۰-۳۱۰ نانومتر جذب می‌کنند و در ارگانیسم‌های مختلفی، مانند سیانوباکترها پروکاریوت‌ها، یوکاریوت‌ها، قارچ، مخمر، جلبک‌ها، جلبک‌های دریایی و مرجان‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات تحت شرایط مختلف از جمله تغییرات دما، نور UV،

با توجه به این که اکثر MAA های گزارش شده تا کنون، دارای وزن مولکولی در محدوده ۲۰۰ تا ۴۰۰ بودند، ترکیب شناسایی شده با پیک ۸۸۷ احتمالاً استخلافات جدیدی از MAA ها است و نیاز به بررسی ساختاری بیش تری برای شناسایی دقیق دارد. البته، مشتقات گلیکوزیده MAA ها با وزن مولکولی بالا قبلاً گزارش شده اند. گزارشی از آنالیز *Nostoc commune* نشان داد که عصاره حاوی MAA های هیبریدی (۱۰۵۰ و ۸۸۰ دالتون) با دو کروموفور مجزا از 3-aminocyclohexen-1-one و 3-diaminocyclohexen-1 متصل به 2-O-(β -xylopyranosyl)- β -galactopyranoside است [۲۶]. گزارش دیگری از همین ارگانسیم که ترکیبی با وزن مولکولی ۱۰۵۰ دالتون با ساختار منحصر به فرد نشان می داد که شامل دو کروموفور مجزا از 3-aminocyclohexen-1-one و 3-diaminocyclohexen-1 و دو فنل پنتوز و هگزوز بود [۲۷].

در بخشی دیگر از این مطالعه اثر آنتی اکسیدانی عصاره ها نیز بررسی شد. ترکیبات مختلف مشتق شده از منابع طبیعی ساکن دریا به عنوان آنتی اکسیدان قوی مورد تأیید قرار گرفته اند که شامل الیگوساکاریدها، پپتیدها، فلوروئتانها (Phlorotannins)، کاروتنوئیدها و ویتامینها هستند. جلبک های دریایی، یکی از منابع بالقوه آنتی اکسیدانی هستند [۲۸]. برای سنجش قدرت آنتی اکسیدانی عصاره های هیدروالکلی استخراجی با حلال های آلی مختلف از آرتروسپیرا پلاتنسیس و کلرلا ولگاریس از تست DPPH استفاده شد. آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و قدرت آنتی اکسیدانی غلظت ۱٪ اسکوربیک اسید در آب حدود ۹۴٪ به دست آمد. نمونه کلرلا ولگاریس و آرتروسپیرا پلاتنسیس استخراج شده با حلال الی متانول مطلق و ۵۰٪ به ترتیب دارای بیش ترین اثر آنتی اکسیدانی بودند. سایر نمونه ها هم اثر آنتی اکسیدانی نسبی نشان دادند. البته احتمال می رود بخشی از این اثرات آنتی اکسیدانی ممکن است ناشی از محتوای پپتیدی استخراج شده همراه با ترکیبات جاذب UV باشد. اثر آنتی اکسیدانی برای MAA های استخراجی و سایر ترکیبات موجود در سیانوباکترها و ریزجلبک ها در سایر مطالعات نیز گزارش شده است [۲۹، ۱۲، ۵]. به عنوان مثال، گروه تحقیقاتی در ایرلند با بررسی سیانوباکترهای دریایی محلی گزارش کردند که با توجه به محتوای خاص MAA و فعالیت های آنتی اکسیدانی، ریزجلبک *Leptolyngbya africana SABC021601* بهترین تولیدکننده ترکیبات MAA از میان گونه های مورد بررسی بوده است [۳۰]. همچنین، نشان داده شده است که شینورین

تغییرات pH و غلظت های مختلف نمک، پایداری خود را حفظ می کنند [۱۱، ۲۱].

همچنین این ترکیبات به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی مهم در جلبک قرمز توصیف شده و از عوامل حفاظت کننده در برابر اشعه ماوراءبنفش به حساب می آیند. از این رو، این متابولیت ها دارای پتانسیل بالایی برای استفاده در ترکیبات حفاظت کننده پوست در فرمولاسیون های محافظتی هستند. جلبک های دریایی برای قرن ها به عنوان غذا و دارو استفاده می شدند. هم چنین عصاره حاصل از جلبک ها نیز به عنوان افزودنی های ارگانیک در بسیاری از مواد غذایی، دارویی، لوازم آرایشی و صنعتی استفاده می شود. اقیانوس های جهان، که بیش از ۷۰٪ از سطح زمین را پوشش می دهند، می توانند یک منبع عظیم برای کشف عوامل درمانی بالقوه به حساب آیند [۲۲]. صنعت لوازم آرایشی و بهداشتی علاقه مند به استفاده از جلبک ها به عنوان منبع مواد زیستی پایدار است، زیرا جلبک ها از نظر بیولوژیکی بسیار غنی هستند و ترکیبات فعال متعددی را سنتز می کنند که برخی از آن ها در حال حاضر به عنوان عوامل فعال در حفاظت و مراقبت از پوست شناخته شده اند [۲۳].

نتایج آنالیزهای انجام شده بر روی MAA ها در این تحقیق نشان داد که کلرلا ولگاریس و آرتروسپیرا پلاتنسیس توانایی تولید ترکیباتی با جذب بیشینه در طول موج حدود ۳۴۰ نانومتر را دارند. هر چند ترکیب اصلی جدا شده توسط عصاره گیری تمام این حلال های آلی مختلف، ماکزیمم جذب هایی در طول موج های پایین تر (۲۷۰ و ۲۹۵ نانومتر) نیز نشان می دهد. میزان بازداری ترکیب اصلی استخراج شده، در ارزیابی HPLC، در حدود ۳ تا ۵ دقیقه مشاهده شد. با توجه به زمان بازداری، قطبیت نسبی این ترکیبات نسبت به فاز متحرک مورد استفاده بالاتر است. این ترکیبات محلول در آب و قطبی هستند، بنابراین، بیش تر اسید آمینه های شبه مایکوسپورینی شناخته شده در زمان ۲ تا ۳ دقیقه اول آنالیز HPLC از ستون فاز معکوس C-18 خارج می شوند. استخلافات یا مشتقات غیر قطبی تر از دسته اسید آمینه های شبه مایکوسپورینی در زمان بازداری بالای ۶ دقیقه هم گزارش شده اند [۲۴]. در آنالیز جرمی محصول استخراج، دو پیک عمده با جذب حدود ۳۲۰ نانومتر شناسایی شد که به ترتیب زمان بازداری، دارای m/z $[H + M]^+$ معادل ۳۴۴ و ۸۸۷ بودند. پیک ۳۴۴ شباهت بیشتری با آمینو اسید شبه مایکوسپورین گلیسین والین (شکل ۹) [۲۵] دارد که باید با مطالعات ساختاری بیش تری تأیید گردد.

استخراج شده از *Fischerella sp.* اثرات آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای دارد [۳۱].

اثر روش و حلال عصاره‌گیری بر کیفیت عصاره و فعالیت زیستی آن پیش از این نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. استخراج ترکیبات فنولی از جلبک اسپیرولینا با استفاده از دو روش اولتراسوند و خیساندن در ۳ حلال الکل (اتانول ۹۶٪) آب-الکل (اتانول ۵۰٪) و آب خالص بررسی شده و تاثیر روش‌های استخراج و غلظت عصاره به دست آمده از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر محتوی فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است. بالاترین مقادیر فنل کل در نمونه عصاره‌گیری شده با اتانول ۹۶٪ به روش خیساندن، و فلاونوئید، آنتوسیانین در نمونه عصاره‌گیری شده با اتانول ۹۶٪ به روش اولتراسوند، مشاهده شده بود. نویسندگان نتیجه‌گیری کردند که استخراج حلال با استفاده از اولتراسوند، استخراج ترکیبات فراسودمند را افزایش داده و منجر به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر شده است [۳۲].

در مطالعه حاضر پتانسیل جذب پرتوهای UV عصاره‌های تهیه شده از *آرتروسپیرا پلاتنسیس* و کلرلا ولگاریس، مورد مقایسه قرار گرفت. مطالعات بسیاری جهت به کارگیری مواد طبیعی جاذب پرتوهای UV در ضدآفتاب‌ها، در حال انجام می‌باشد و ریزجلبک‌ها یکی از ارگانسیم‌های طبیعی جاذب پرتوهای UV هستند. ریزجلبک اسپیرولینا (آرتروسپیرا) سیانوباکتری است که دارای ترکیبات جاذب پرتوهای UV، هم‌چون فلاونوئیدها می‌باشد. فلاونوئیدها به دلیل توانایی جذب حداکثر طول موج در محدوده پرتوهای UV و هم‌چنین به دلیل افزایش فاکتور محافظت‌کنندگی از پرتوهای (Sun) UV Protection Factor, SPF امکان استفاده به عنوان مواد طبیعی در ضدآفتاب را ایجاد می‌کنند [۲].

میزان جذب اشعه UV-A در محدوده ۳۲۰-۴۰۰ nm و اشعه UV-B در محدوده ۲۹۰-۳۲۰ nm عصاره کلرلا ولگاریس استخراج شده در حلال‌های ۱۰٪ اتانول و متانول، حداکثر جذب در این ناحیه را نشان دادند و به ترتیب با افزایش درصد حلال متانول و اتانول، کاهش میزان جذب مشاهده شد. در عصاره *آرتروسپیرا پلاتنسیس* این روند معکوس مشاهده شد و نمونه استخراج شده با متانول ۵۰٪ و ۱۰۰٪ دارای طیف جذبی بالاتری در محدوده UV-A و UV-B بود. به‌طور کلی، نمونه *آرتروسپیرا پلاتنسیس* استخراج شده با متانول ۱۰۰٪ و نمونه کلرلا ولگاریس استخراج شده با اتانول ۱۰٪ دارای بیش‌ترین میزان جذب در محدوده UV-A و UV-B (۲۹۰-۴۰۰ nm) بودند. در مطالعه حاضر، از گونه‌های بومی موجود استفاده شد که در شرایط معمول کشت

داده شده بودند و هیچ‌گونه تغییری در محیط کشت و یا شرایط کشت برای دستیابی به مقادیر تقویت شده از ترکیبات جاذب UV، از جمله ترکیبات MAA، انجام نشده بود. با توجه به سایر مطالعات انجام شده، احتمال می‌رود که استفاده از کشت بهینه این ریزجلبک‌ها بتواند در دستیابی به منبع مطلوب‌تری از ترکیبات جاذب UV مؤثر واقع شود.

در مطالعات پیشین، قابلیت استفاده از *C. vulgaris* به عنوان یک ترکیب محافظ نور و تثبیت‌کننده نور ارزیابی شده بود. در یک مطالعه، شرایط مختلف کشت با غلظت‌های مختلف نیتروژن مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج بهتری در شرایط حاوی غلظت ۸/۸ میکرومولار نیتروژن گزارش شده بود. اضافه کردن این عصاره *C. vulgaris* در فرمولاسیون‌های ضدآفتاب با درصدهای ۱، ۵ و ۱۰ بررسی و اثر محافظت از نور فرمولاسیون و افزایش قابل توجهی در SPF هنگام استفاده از عصاره *C. vulgaris* به میزان ۱۰٪ تأیید شد، با این حال، این عصاره اثر تثبیت‌کننده نور را در هیچ یک از غلظت‌های آزمایش شده، نشان نداده است [۳۳]. مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۰ نشان داد که ۷٪ عصاره ریزجلبک اسپیرولینا در فرمولاسیون حاوی روغن زیتون: موم کندلیا به نسبت ۳۵:۷ دارای SPF خوب (۲۹/۰۶) است که در دسته‌بندی فوق‌العاده SPF قرار می‌گیرد و دارای امتیاز پایداری خوب (۱۷/۳۳ از ۲۰) است. البته تأکید این مطالعه بر فلاونوئیدهای استخراجی از اسپیرولینا بود [۳۴]. مطالعه دیگری نشان داد که عصاره اتانولی اسپیرولینا دارای فاکتور محافظتی بالاتری نسبت به سایر عصاره‌های مورد مطالعه بوده است (SPF ۱۱/۹۴±۰/۰۰). هم‌چنین این عصاره نسبت به سایر عصاره‌ها میزان کربوهیدرات بیش‌تری (۲/۳۹±۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) داشت. هرچند عصاره آبی دارای بیش‌ترین میزان فیکوبیلی پروتئین و راندمان استخراج در بین سایر عصاره‌های لیوفیلیزه شده (۹۰٪) بوده است [۲].

استفاده از عصاره‌های بهینه به دست آمده از مطالعه حاضر در یک فرمولاسیون کامل ضد آفتاب باید مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گیرد. این موارد در مطالعات آتی مورد بررسی قرار خواهد گرفت. هدف نهایی مطالعات انجام شده و در دست انجام، دستیابی به یک فرآورده ضد آفتاب حاوی ترکیبی از عصاره ریزجلبکی مختلف به منظور بهره‌برداری از ویژگی‌ها و اثرات فارماکولوژیک متفاوت آن‌ها به صورت هم‌زمان در یک فرآورده واحد می‌باشد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، عصاره هیدروالکلی دو ریزجلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس* و کلرلا ولگاریس مورد بررسی دارای ترکیباتی هستند که توانایی جذب اشعه مضر

sun-induced skin damage. Eur J Pharm Sci 2017; 104: 52-64.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.026>

PMid:28341613

[6] Naeemi AS, Sarmad J, Rahnama N, Fallah SF. Comparing the effects of different intensities of ultraviolet radiation on the green eukaryotic microalgae, *Chlorella* sp., and blue-green prokaryotic microalgae, *Anabaena* sp. Aquatics Physiol Biotech 2016; 4: 1-26.

[7] Rastogi RP, Sinha RP, Moh SH, Lee TK, Kottuparambil S, Kim Y-J, et al. Ultraviolet radiation and cyanobacteria. J Photochem Photobiol B Biol 2014; 141: 154-169.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.020>

PMid:25463663

[8] Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. Nat Prod Rep 2018; 35: 8-53.

<https://doi.org/10.1039/C7NP00052A>

PMid:29335692

[9] Gupta A, Singh AP, Singh VK, Singh PR, Jaiswal J, Kumari N, et al. Natural sun-screening compounds and DNA-repair enzymes: photoprotection and photoaging. Catalysts 2023; 13: 745.

<https://doi.org/10.3390/catal13040745>

[10] Ansari R, Foroughinia F, Dadbakhsh AH, Afsari F, Zarshenas MM. An overview of pharmacological and clinical aspects of spirulina. Curr Drug Discov Technol 2023; 20: 74-88.

<https://doi.org/10.2174/1570163820666221129141217>

PMid:36453480

[11] Jain S, Prajapat G, Abrar M, Ledwani L, Singh A, Agrawal A. Cyanobacteria as efficient producers of mycosporine-like amino acids. J Basic Microbiol 2017; 57: 715-727.

<https://doi.org/10.1002/jobm.201700044>

PMid:28543536

[12] Hartmann A, Murauer A, Ganzera M. Quantitative analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae by capillary electrophoresis with diode-array detection. J Pharm Biomed Anal 2017; 138: 153-157.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.053>

PMid:28213175 PMCID:PMC5388179

[13] Lawrence KP, Long PF, Young AR. Mycosporine-like amino acids for skin photoprotection. Curr Med Chem 2018; 25: 5512-5527.

<https://doi.org/10.2174/0929867324666170529124237>

PMid:28554325 PMCID:PMC6446518

[14] Berthon JY, Nachat-Kappes R, Bey M, Cadoret JP, Renimel I, Filaire E. Marine algae as attractive source to skin care. Free Radic Res 2017; 51: 555-567.

<https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1355550>

PMid:28770671

[15] Candelo V, Llewellyn CA. Separating and purifying mycosporine-like amino acids from cyanobacteria for application in commercial sunscreen formulations. Bio Tech 2023; 12: 16.

<https://doi.org/10.3390/biotech12010016>

PMid:36810443 PMCID:PMC9944071

[16] Fathi F, Hosseinabadi T, Faraji A, Tabarzd M. Different sources of mycosporine-like amino acids: Natural, heterologous expression, and chemical synthesis/modifications. Future Nat Prod 2022; 8: 78-85.

[17] Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chem 2009; 113: 1202-1205.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

[18] Talebpour Amiri F, Mirzaee F, Fadaee Heydarabadi P, Enayatifard R, Goli H, Shahani S. The effect of a topical ointment containing methanol extract of *Buxus hyrcana* Pojark. leaves on cutaneous wound healing in rats. Koimesh 2023; 25: 48-56. (Persian).

[19] Sabrina AP, Tania E, Nuryamah S, Yuniarsih N. The potential of natural ingredients as sunscreen: A narrative literature review. Indon J Medic Rev 2022; 2: 237-241.

<https://doi.org/10.37275/oajimr.v2i4.221>

[20] Wu H, Gao K, Villafaña Virginia E, Watanabe T, Helbling EW. Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *arthrosira platensis*. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 5004-

ماوراء بنفش را دارند. این ترکیبات در عصاره دو ریزجلیک با یکدیگر متفاوت بوده و استفاده از سیستم‌های حلال متفاوت در استخراج می‌تواند باعث تغییر در ترکیبات و درصد ترکیبات استخراجی از منبع شود. با توجه به اثرات زیستی متفاوت انواع مختلف ترکیبات زیست فعال انتظار می‌رود که استفاده هم‌زمان از عصاره دو ریزجلیک آرتروسپیرا پلاتنسیس و کلرلا ولگاریس بتواند باعث بهبود و تقویت اثر آنتی‌اکسیدانی و جذب اشعه UV شود. در مطالعات آتی، استفاده از عصاره‌های خشک شده این ریزجلیک‌ها در فرمولاسیون مناسبی برای ایجاد محصول ضدآفتاب و یا طراحی فرمولاسیون ضد آفتاب با نانوذرات تیتانیوم دی اکسید یا زینک اکسید بیوسنتز شده با عصاره این ریزجلیک‌ها مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی دانشکده داروسازی شهید بهشتی (کد طرح: ۴۳۰۰۳۶۱۵) انجام شده است و در کمیته اخلاق دانشکده داروسازی شهید بهشتی مورد تأیید قرار گرفته است (کد اخلاق:

(IR.SBMU.PHARMACY.REC.1401.176).

مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است: طاهره حسین‌آبادی و مریم تبرزد: ایده و طراحی مطالعه، فاطمه نجفلی: جمع‌آوری داده‌ها، فاطمه نجفلی و مریم تبرزد: آنالیز و تفسیر نتایج، مریم تبرزد و طاهره حسین‌آبادی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تأیید نمودند.

منابع

[1] Chrapusta E, Kaminski A, Duchnik K, Bober B, Adamski M, Bialczyk J. Mycosporine-like amino acids: Potential health and beauty ingredients. Mar Drugs 2017; 15: 326.

<https://doi.org/10.3390/md15100326>

PMid:29065484 PMCID:PMC5666432

[2] Aslani L, Shabanpour B, Pourashouri P, Payamnoor V, Adeli A. Comparison of UV absorption potential and phycobiliproteins amount extracted with the help of solvent and ultrasound from (*Spirulina platensis*) microalgae. Utiliz Cultiv Aquatics 2021; 10: 81-96.

[3] Gharib R, Tabarzd M, Hosseinabadi T. Effect of high salinity on mycosporine-like amino acid production in *desmodesmus* sp. Trends Pept Protein Sci 2020; 5: 1-6 (e2).

[4] Saber K, Majdaeen M, Rahbar S, Elmtalab S, Zamani H, Abedi-Firouzjah R. Radiation protective effect of green tea extract in mice irradiated with gamma rays. Koimesh 1400; 23: 785-793. (Persian)

[5] Souza C, Campos PM. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants *Spirulina* and dimethylmethoxy chromanol on

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.07.003>

PMid:21813286

[28] Ren S, Li J, Guan H. The antioxidant effects of complexes of tilapia fish skin collagen and different marine oligosaccharides. *J Ocean Univ China* 2010; 9: 399-407.

<https://doi.org/10.1007/s11802-010-1766-1>

[29] Taghavi Takyar MB, Haghghat Khajavi S, Safari R. Evaluation of antioxidant properties of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. *LWT Food Sci Technol* 2019; 100: 244-249.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.079>

[30] Browne N, Otero P, Murray P, Saha SK. Rapid screening for mycosporine-like amino acids (MAAs) of irish marine cyanobacteria and their antioxidant potential. *Sustainability* 2023; 15: 3792.

<https://doi.org/10.3390/su15043792>

[31] Singh V, Pathak J, Pandey A, Ahmed H, Rajneesh, Kumar D, et al. UV-induced physiological changes and biochemical characterization of mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium *Fischerella* sp. strain HKAR-13. *South Afr J Bot* 2022; 147: 81-97.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.004>

[32] Baghizadeh Kohestani B, Goli M, Shahi S. The survey of bioactive compounds extraction from *Spirulina platensis* algae by ultrasound-assisted ethanolic maceration. *J Food Sci Technol* 2023; 20: 45-57. (Persian)

[33] Santos BBd. In vitro photoprotective attributes from the *Chlorella vulgaris* cultivated in photobioreactor [dissertation]. São Paulo: University of São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2022 [cited 2023-07-09].

[34] Dianursanti, Prakasa MB, Nugroho P. The effect of adding microalgae extract *Spirulina platensis* containing flavonoid in the formation of Sunscreen towards cream stability and SPF values. *AIP Conference Proceedings; The 4th international tropical renewable energy conference (i-TREC 2019)*, Bali, Indonesia. AIP Publish LLC 2020; 2255

<https://doi.org/10.1063/5.0015249>

5013.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5004-5013.2005>

PMid:16151080 PMCID:PMC1214621

[21] Rastogi RP, Madamwar D, Incharoensakdi A. Sun-screening bioactive compounds mycosporine-like amino acids in naturally occurring cyanobacterial biofilms: role in photoprotection. *J Appl Microbiol* 2015; 119: 753-762.

<https://doi.org/10.1111/jam.12879>

PMid:26099286

[22] Raja A, Vipin C, Aiyappan A. Biological importance of marine algae-an overview. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2013; 2: 222-227.

[23] Guillerme J-B, Couteau C, Coiffard L. Applications for marine resources in cosmetics. *Cosmetics* 2017; 4: 35.

<https://doi.org/10.3390/cosmetics4030035>

[24] Roullier C, Chollet-Krugler M, Pferschy-Wenzig EM, Maillard A, Rechberger GN, Legouin-Gargadennec B, et al. Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. *Phytochemistry* 2011; 72: 1348-1357.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.002>

PMid:21550091

[25] Rosic NN. Mycosporine-like amino acids: making the foundation for organic personalised sunscreens. *Mar Drugs* 2019; 17: 638.

<https://doi.org/10.3390/md17110638>

PMid:31726795 PMCID:PMC6891770

[26] Nazifi E, Wada N, Asano T, Nishiuchi T, Iwamuro Y, Chinaka S, et al. Characterization of the chemical diversity of glycosylated mycosporine-like amino acids in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Photochem Photobiol B Biol* 2015; 142: 154-168.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.008>

PMid:25543549

[27] Matsui K, Nazifi E, Kunita S, Wada N, Matsugo S, Sakamoto T. Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Photochem Photobiol B Biol* 2011; 105: 81-89.

Comparison of *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.) and *Chlorella* sp. Extracts Concerning the UV Absorption Values and Anti-Oxidant Activity

Fatemeh Najafli (M.Sc)¹, Tahereh Hosseinabadi (Ph.D)², Maryam Tabarzad (Ph.D)^{*3}

1- Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

2 - Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Protein Technology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21 88648124

m_tabarzad@sbmu.ac.ir

Received: 7 May 2023; Accepted: 23 Aug 2023

Introduction: Microalgae have been approved as a good source of UV radiation protective compounds, such as mycosporin-like amino acids (MAAs), carotenoids and polyphenols. *Spirulina* (*Arthrospira*) and *Chlorella* gain much attraction in the skin care market as natural sources of available products.

Materials and Methods: In this study, different extracts were prepared from the dry powder of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. Partial purification of MAA compounds was performed. The extracted compounds were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry and the sample's Ultraviolet (UV) absorption in the range of UV-A (400-315 nm) and UV-B (315-280 nm) was measured by spectrophotometric method. The total protein content of the extracts and their antioxidant effect were also analyzed.

Results: The samples extracted with methanol showed a higher percentage of compounds with similar characteristics to mycosporine-like amino acids, and had notable antioxidant activity. In mass spectrometry, two major peaks with a molecular mass equivalent to m/z 344 and 887 were identified. The samples extracted from both microalgae had more compounds with maximum absorption at the UV-A and UV-B range, with 50% and 100% methanol. In general, the methanol extraction of UV-absorbing compounds from both *C. vulgaris* and *A. platensis* led to an increase in the extraction yield.

Conclusion: According to the different features of samples, using a combination of them as natural sources for the preparation of sunscreens may be beneficial to make an efficient product.

Keywords: Antioxidants, Ultraviolet Rays, Microalgae, *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*