

تعیین فعالیت آنتیاکسیدانی و میزان فنول کل دوگونه جلبک دریایی خلیج فارس (*Chaetomorpha sp*) و قهوهای آزمایشگاهی (*In vitro*) در شرایط آزمایشگاهی (*Colpomenia sinuosa*)

پروسا سفری^۱، مسعود رضائی^{*}، امیررضا شویکلو^۱، الهام گرمیسری^۱، آریا باباخانی لشکان^۲

۱. فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی صومعه سرا، دانشگاه گیلان، ایران

چکیده

امروزه آنتیاکسیدان‌های طبیعی نسبت به سنتزی سالم‌تر و ایمن‌تر بوده و محدود به منابع خشکی نمی‌باشند. براساس منابع علمی جلبک‌های دریایی منبعی غنی از ترکیبات آنتیاکسیدانی طبیعی هستند. در این مطالعه خاصیت آنتیاکسیدانی دو گونه جلبک سبز *Chaetomorpha sp* و جلبک قهوهای *Colpomenia sinuosa* و تأثیر حلال‌های مختلف در استخراج ترکیبات آنتیاکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌ها براساس روش استخراج غوطه‌وری طی ۲۶ ساعت در دمای اتاق (۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد) توسط حلال‌های استون، اتانول، متانول در ترکیب با آب (۳۰/۷۰٪) و آب ۱۰۰٪ استخراج شدند. محتوای فنول کل و میزان قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH و فعالیت آنتیاکسیدانی کل عصاره‌های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره‌های استونی قابلیت بیشتری برای استخراج ترکیبات آنتیاکسیدانی و پلی‌فنولی در مقایسه با سایر تیمارها داشته‌اند. همچنین گونه *Chaetomorpha sp* در مقایسه با گونه *C. sinuosa* میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن و فعالیت آنتیاکسیدانی بالاتری نشان داد اما گونه قهوهای فعالیت جذب رادیکال بالاتری داشت. تفاوت در میزان استخراج ترکیبات آنتیاکسیدانی می‌تواند به نوع حلal، ترکیب هدف و نوع گونه جلبک بستگی داشته باشد. از این رو جلبک‌ها پتانسیل استفاده به عنوان منابع طبیعی آنتیاکسیدان‌ها در صنایع غذایی و دارویی را دارا می‌باشند.

واژگان کلیدی: ترکیبات فنولی، قدرت کاهندگی آهن، آنتیاکسیدان طبیعی، جلبک سبز *Chaetomorpha sp*، جلبک قهوهای *Colpomenia sinuosa*

*نویسنده مسؤول، پست الکترونیک: rezai_ma@modares.ac.ir

طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه بوده که رنج گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیک را سبب می‌شود (Gupta *et al.*, 2011). اخیراً بیشتر توجهات بر فعالیت ضدتوموری و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات جلبکی معطوف شده است (Heo *et al.*, 2005). نتایج نشان داده‌اند که ماکروجلبک‌های دریایی دارای آنتی‌اکسیدان‌های مختلف طبیعی شامل پلی‌فنول‌ها هستند و نقشی مهم در جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها که عامل اصلی در کاهش کیفیت غذاهای گوشتی در طول فرآوری و ذخیره‌سازی می‌باشد، ایفا می‌کنند (Kuda *et al.*, 2005). ترکیبات فنولی شامل فلاونوئیدها، فلوروتانین‌ها، اسیدهای فنولی و تانین‌ها بوده که عوامل مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان و جلبک‌ها هستند. فلوروتانین‌ها سطوح بالایی در جلبک‌های قهقهه‌ای نشان می‌دهند. این ترکیبات نقش مهمی در حفاظت از جلبک‌های دریایی در برابر علف‌خواران دریایی، پاتوژن‌ها و اپی‌فیت‌ها ایفا می‌کنند (Blanc *et al.*, 2011).

ترکیبات فنولی به دلیل عملکردهای ضداکسایشی و ضدتوموری مورد توجه قرار گرفته‌اند و معمولاً در جلبک‌های دریایی قهقهه‌ای، قرمز و سبز دیده می‌شوند. ترکیبات بالقوه آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌ها شامل برخی رنگدانه‌ها (فوکوزانتین، آستازانتین و کارتنتوئیدها و ...) و پلی‌فنول می‌باشد (Souza *et al.*, 2011). مطالعات نشان داده‌اند که مواد غذایی با افزودن ساختارهای شیمیایی گیاهی مثل ترکیبات فنولی اثرات بالقوه محافظت‌کننده در برابر بسیاری از بیماری‌ها دارا می‌باشد (Mariod *et al.*, 2009).

۱. مقدمه

انواع اکسیژن یکتا در فرم‌های رادیکالی آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید در طول متابولیسم ارگانیسم‌های زنده تولید می‌شود (Keyrouz *et al.*, 2011). لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA دیگر اجزای سلولی، مولکول‌های هدف برای روندهای تحریبی رادیکال‌های تولید شده هستند (Ruberto *et al.*, 2001). مقادیر بیش از حد این مولکول‌ها، مضر بوده و از طریق اکسیداسیون بیومولکولی منجر به بیماری و اختلالات متعددی چون سرطان، انفاکتوس، دیابت و آزالایمر می‌شوند (Li *et al.*, 2009). آنتی‌اکسیدان‌ها در سیستم‌های زیستی عملکردهای مختلفی دارند. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مثل بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)^۱، بوتیل هیدروکسی‌آنیزول (BHA)^۲ و tert-بوتیل‌هیدروکینون (TBHQ)^۳ به طور تجاری در دسترس بوده و معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما نگرانی در مورد اثرات سمی استفاده از آن‌ها در صنعت غذایی، منجر به گسترش تحقیقات در باب آنتی‌اکسیدان‌های جایگزین از منشأ طبیعی شده است (Meenakshi *et al.*, 2012).

آنتی‌اکسیدان‌های موجود در گیاهان خشکی بسیاری از منابع دریایی نیز برای کاوشن ترکیبات زیست‌فعال جهت ساخت دارو و غذاهای سلامتی‌بخش مورد توجه قرار گرفته‌اند. در طول دهه‌ی گذشته، جلبک‌های دریایی یا عصاره آن‌ها به عنوان منبعی جدید از ترکیبات زیست‌فعال مورد توجه قرار گرفته‌اند زیرا قادر به تولید

¹ Butylated hydroxytoluene

² Butylated hydroxyanisole

³ tert-Butylhydroquinone

پایدار و دلایل فنیل‌پیکریل-هیدرازیل^۵ از نمایندگی مرک و اپلیکم و شارلو تهیه شدند. حلال‌های مصرفی از نوع مرک و با خلوص بالا بودند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

جلبک‌های دریایی به طور تازه از سواحل بوشهر در منطقه جزرومدی جمع‌آوری شدند و پس از تهیه نمونه‌های فیکس شده جهت شناسایی به مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی بوشهر منتقل و توسط کارشناسان موسسه شناسایی شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله توسط آب دریا و آب شیرین شستشو شد تا باقی‌مانده ذرات اپی‌فیت، دانه‌های شن و ماسه از آن‌ها برداشته شود. سپس نمونه‌ها در سایه خشک شده و توسط کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌کیپ در بسته‌های غیرقابل نفوذ به نور به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها Freeze Dryer، OPR-، FDU-7012، OPERON در یک آسیاب الکتریکی (Mulinex، Electric Grinder، La Molinette، 1000w، فرانسه) به پودر تبدیل شدند.

استخراج عصاره‌ها

۵ گرم پودر جلبکی فریزدرای شده با نسبت ۱:۲۰ (جلبک: حلال آلی) در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال‌های استون، متانول، اتانول در ترکیب با آب با نسبت ۳۰/۷۰ و آب ۱۰۰٪ توسط روش غوطه‌وری مورد استخراج قرار گرفتند. استخراج نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک آنکوباتور شیکر (Shaker Incubator، اسپانیا) و در دمای آزمایشگاه (۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد) انجام پذیرفت. سپس عصاره‌ها با کاغذ صافی (واتمن ۴۲) فیلتر شده و

در این مطالعه دو گونه جلبک دریایی خلیج فارس در فصل تابستان از سواحل بوشهر برداشت شدند. این دو گونه شامل *Chaetomorpha sp* که یک گونه جلبک سبز بوده و در قسمت‌های بالای جزرومدی، چاله‌های کم‌عمق روی بسترها صخره‌ای رویش دارد و گونه قهقهه‌ای *Colpomenia sinuosa* که عمدتاً در قسمت‌های پایینی و کم‌عمق جزرومدی روی بسترها صخره‌ای مسطح یا به صورت اپی‌فیت روی جلبک‌های بزرگ رویش دارد.

هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک سبز (*Chaetomorpha sp*) و جلبک قهقهه‌ای (*Colpomenia sinuosa*) و تأثیر استفاده از حلال‌های مختلف برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک‌ها می‌باشد. بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی این دو گونه، توسط آزمایشات میزان فنول کل و قدرت کاهنده‌ی آهن، قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل صورت گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

تری‌کلرید آهن^۱، پتاسیم فری‌سیانید^۲، تری‌کلرواستیک اسید، پتاسیم هیدروژن فسفات، سدیم کربنات، اسید سولفوریک، آمونیوم هپتامولیبدات^۳، اسید آسکوربیک^۴، اسید تانیک، معرف فولین-سیوکالتو، رادیکال

¹ FeCl₃-6H₂O

² C₆Fek₅N₃

³ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O

⁴ C₆H₈O₈

آبی (Water bath, Memert) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفته و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر توسط دستگاه Spectrophotometer, Lambda-PerkinElmer precisely (آمریکا) خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از محلول آسکوربیک اسید در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج بر اساس میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شد. معادله منحنی استاندارد برابر با رابطه (۲) می‌باشد:

(۲)

$$(Y=0.0032x, R_2=0.99)$$

قدرت کاهندگی آهن

طبق روش (Chew *et al.*, 2008)، ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول با فرسفات pH=۶.۶ اضافه شد و پس از اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱٪ انکوباسیون نمونه‌ها به Water bath, Memert (آلمان) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام مدت ۲۰ دقیقه در یک حمام آبی (Water bath, Memert) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌ها پس از اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتی‌یفوژ شدند (Centrifuge, Z206A-HERMLE آلمان) و در ادامه با اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر FeCl₃ ۰/۱٪ به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول بالا، به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند و در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Lambda-Spectrophotometer, PerkinElmer (آمریکا) در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد و نتایج

پس از سانتی‌یفوژ (دمای ۴ درجه سلسیوس، Centrifuge, Z36HK-HERMLE آلمان) تا زمان انجام آزمایشات در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین میزان فنول کل

از روش Taga و همکاران (۱۹۸۴) برای تعیین فنول کل استفاده شد. به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره، ۴ میلی‌لیتر Na₂Co₃ ۰.۲٪ اضافه و پس از ۲ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر محلول فولین-سیوکالتو ۰.۵٪ به آن اضافه شد، نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر Spectrophotometer, Lambda-PerkinElmer precisely (آمریکا) خوانده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید به گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شد. جهت رسم منحنی استاندارد از محلول اسید تانیک در غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. معادله منحنی استاندارد برابر با رابطه (۱) می‌باشد.

(۱)

$$(Y=0.0138x, R_2=0.9946)$$

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC)^۱

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌های جلبکی با روش (Prieto *et al.*, 1999) اندازه‌گیری شد. ۰/۶ میلی‌لیتر نمونه با ۶ میلی‌لیتر محلول معرف (۰/۶ مولار اسید سولفوریک، ۲۸ میلی مولار فسفات‌سدیم و ۴ میلی مولار آمونیوم مولیبدات) مخلوط و محلول حاصل در حمام

^۱ Total antioxidant capacity

جذب نمونه و محلول DPPH بعد از زمان مورد نظر تجزیه و تحلیل آماری تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد. آزمایش‌ها بر اساس طرح فاکتوریل و به صورت کاملًا تصادفی طراحی شد. پس از بررسی نرمالیته داده‌ها، برای بررسی اثرات معنی‌دار بین گونه‌ها و اثرات حلال‌های مختلف و از مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (Microsoft Office, 2010) استفاده شد.

۳. نتایج

انتخاب غلظت مناسب حلال برای استخراج در مطالعه حاضر، از حلال‌های آب، متانول، اتانول و استون که دارای محدوده‌های خاصی از قطبیت هستند، برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال استفاده شد. نتایج استخراج ترکیبات فنولی توسط این حلال‌ها در جدول ۱ برای دو گونه *Colpomenia sp* و *Chaetomorpha sinuosa* آورده شده است. به منظور انتخاب بهترین نسبت حلال:آب برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از دو گونه جلبک مورد مطالعه، چهار نسبت متفاوت حلال‌های مختلف استون، اتانول و متانول در ترکیب با آب (٪۳۰، ٪۵۰ و ٪۷۰ و ٪۱۰۰ حجمی/حجمی) برای استخراج اولیه مورد استفاده قرار گرفت و میزان فنول کل عصاره‌های استخراج شده اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیزها نشان داد که غلظت ٪۳۰ در حلال‌های مختلف

بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید به گرم پودر جلبکی بیان شد. جهت رسم منحنی استاندارد از محلول اسیدتانیک در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. فرمول منحنی استاندارد اسید تانیک برای میزان کاهندگی آهن به صورت فرمول (۴) می‌باشد.

(۴)

$$(Y = 0.0117x, R^2 = 0.9954)$$

قدرت خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH)^۱ بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار و دی‌فنیل‌پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، طبق روشن (Brand-Williams et al., 1995) انجام شد. عصاره‌های مختلف به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی‌مolar رادیکال آزاد DPPH افزوده شد و ۱ Vortex, IKA, MS 3b دقیقه توسط دستگاه ورتكس (آلمان) به خوبی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد تا تغییر رنگ در آن صورت بگیرد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با Spectrophotometer, Lambda-PerkinElmer precisely استفاده از اسپکتروفتوometر (آمریکا) خوانده شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رادیکالی عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه خواهد شد.

$$RSA\% = [1 - ((A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})/A_{\text{control}})] \quad (3)$$

جذب نمونه بعد از زمان A_{sample}
موردنظر

$$\text{جذب کنترل بعد از زمان } A_{\text{control}}$$

^۱ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

استخراج مشاهده می‌شود. در مقایسه بین حلل‌های مختلف که برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت، عصاره‌ی استونی با میزان ۰/۵۶ میلی‌گرم تانیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشکشده (شکل ۱a) نسبت به دیگر حلل‌ها میزان فنول بیشتری را استخراج کرد ($p < 0/05$).

بالاترین میزان فنول کل را استخراج کرد (جدول ۱). آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که گونه‌ی *Colpomenia sp sinuosa* دارای میزان فنول کل بیشتری بوده است و این روند در تمامی حلل‌های مورد استفاده برای

جدول ۱: نتایج انتخاب غلظت بهینه برای استخراج براساس میزان فنول کل

میزان فنول کل (میلی‌گرم تانیک‌اسید/گرم پودر جلبکی خشکشده)							
<i>Colpomenia sinuosa</i>				<i>Chaetomorpha sp</i>			
حلل	استون	اتanol	متanol	حلل	استون	اتanol	متanol
%۱۰۰	%۷۰	%۵۰	%۳۰	%۱۰۰	%۷۰	%۵۰	%۳۰
۰/۰۴ ^d	۰/۱۶ ^b	۰/۱۰ ^c	۰/۲۱ ^a	۰/۰۵ ^d	۰/۴۳ ^c	۰/۶۴ ^b	۰/۸۱ ^a
۰/۰۵ ^d	۰/۱۰ ^b	۰/۰۹ ^b	۰/۱۷ ^a	۰/۰۶ ^d	۰/۲۶ ^c	۰/۴۴ ^b	۰/۴۶ ^a
۰/۰۸ ^b	۰/۰۳ ^c	۰/۰۹ ^b	۰/۲۰ ^a	۰/۳۴ ^b	۰/۲۱ ^c	۰/۳۵ ^b	۰/۵۸ ^a

*حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر دیف است

کاهندگی آهن بالاتری نسبت به گونه *Colpomenia sinuosa* در بین تیمارها نشان داد. حلل استون در مقایسه با سایر حلل‌ها با مقدار ۰/۰۶ میلی‌گرم تانیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشکشده ($p < 0/05$) در این دو گونه قدرت کاهندگی آهن بالاتری داشته است. حلل‌های متanol، اتانول و آب با مقدار ۰/۰۴۶، ۰/۰۴۱ و ۰/۰۳ میلی‌گرم تانیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشکشده (شکل ۱b) در رده‌های بعدی قرار داشتند ($p < 0/05$). فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH گونه‌های جلبکی مورد مطالعه توسط تغییر در جذب DPPH ایجاد شده به دلیل واکنش رادیکال پایدار DPPH اندازه‌گیری شد. درصد جذب رایکال آزاد در شکل ۱c و ۱g قابل ملاحظه می‌باشد. نتایج نشان داد که قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH در گونه *Colpomenia sinuosa* در تمامی عصاره‌های حلالی استخراج، بالاتر از گونه *Chaetomorpha sp* بوده است.

از نظر میزان محتوای فنولی، حلل‌های متanol، اتانول و آب به ترتیب با مقدار ۰/۳۲، ۰/۳۲ و ۰/۲۳ میلی‌گرم تانیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشکشده بعد از حلل استون قرار گرفتند ($p < 0/05$). مقایسه اثر همکنش فاکتورهای نوع گونه و نیز حلل مورد استفاده در شکل ۱e نشان داد که گونه *Chaetomorpha sp* نسبت به گونه *Colpomenia sinuosa* در حلل استون با مقدار ۰/۸۱ میلی‌گرم تانیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشکشده بالاترین کارایی را در استخراج ترکیبات فنولی نسبت به سایر تیمارها داشته است. به طور کلی افزودن آب به حلل‌های آلی موجب افزایش استخراج ترکیبات فنولی شده است. در مورد قدرت کاهندگی آهن، همانطور که از شکل ۱f مشاهده می‌شود در مقایسه بین اثرات متقابل گونه و حلل گونه *Chaetomorpha sp* با مقدار ۰/۰۷ میلی‌گرم تانیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشکشده قدرت

۱h) بسیار بالاتر از سایر تیمارهای استخراج بود ($p < 0.05$). در مقایسه بین حلال‌های مورد استفاده اختلاف معنی‌داری بین عصاره استونی با مقدار ۰/۰۹ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشک‌شده (شکل ۱d) در مقایسه با سایر حلال‌های استخراج در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان داد ($p < 0.05$). در جدول ۲ داده‌های بدست آمده از دیگر محققان برگونه‌های مختلف آورده شده است که اطلاعاتی کلی در مورد میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گونه مختلف بدست می‌دهد البته همانطور که در جدول مشاهده می‌شود در استخراج گونه‌های مختلف از حلال‌های متفاوت استفاده شده و بیان میزان نهایی داده‌ها براساس واحدهای مختلف صورت گرفته است، براساس آنچه از منابع علمی بدست می‌آید میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به طور کلی در جلبک‌های قهقهه‌ای و قرمز بیشتر از جلبک‌های سبز می‌باشد، البته این مسئله یک قانون کلی نبوده و بسته به نوع گونه جلبک، اقلیم و شرایط زیستی گونه‌ها متفاوت بوده که می‌تواند بر میزان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فولی آن‌ها تأثیرگذار باشد.

دیگر حلال‌ها از نظر قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH در ترتیب زیر قرار داشتند: استون<متانول<اتanol<آب (شکل ۱c) و مقادیر ۰/۷۵، ۰/۶۱، ۰/۵۹ و ۵/۳۱ (RSA%). در مقایسه اثر همزمان *Colpomenia sinuosa* گونه و حلال مورد استفاده گونه در حلال استون با درصد جذب رادیکال آزاد ۹۹/۱۶٪ (شکل ۱g) کارایی بالاتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. هر چند این تفاوت بین حلال‌هایی اتانول، متانول در گونه *Colpomenia sinuosa* چندان معنی‌دار دیده نشد. اما همانطور که از شکل ۱g دیده می‌شود حلال آب در هر دو گونه پایین‌ترین فعالیت را نسبت به دیگر تیمارها از داشت به طوریکه این میزان در هر دو گونه به صفر نزدیک بوده و اثرات جذب رادیکال آزاد بسیار ضعیفی از خود نشان دادند. همانطور که در شکل ۱d نشان داده شده است واضح است که استفاده از حلال‌های مختلف برای تهییه عصاره‌های استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های مورد بررسی، تأثیرگذار بوده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در عصاره تهییه‌شده توسط حلال استون در گونه *Chaetomorpha sp* با مقدار ۰/۱۵ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشک‌شده (شکل

جدول ۲. نتایج مطالعات دیگر محققان برگونه‌های مختلف جلبک به همراه حلال‌های استخراج و میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

نام گونه	حلال استخراج	میزان فول کل	منبع
Brown seaweeds			
<i>Sargassum marginatum</i>	Methanol/water	11.00(mg gallic acid/g extract)	(Chandini <i>et al.</i> , 2008)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Aqueous Methanol	115(mg GAE/100 g dried algae)	(Chew <i>et al.</i> , 2008)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Acetone	0.963 (% of total phenols / dry weight basis)	(Suresh Kumar <i>et al.</i> , 2008)
<i>Scytoniphon lomentaria</i>	Ethanol	0.18 (mg catechin equivalent/g dried algae)	(Kuda <i>et al.</i> , 2005)
<i>Papenfussiella kuromo</i>	Ethanol	0.61 (mg catechin equivalent/g dried algae)	(Kuda <i>et al.</i> , 2005)
<i>Turbinaria confides</i>	Methanol/water	29.01 (mg gallic acid equivalents/g extract)	(Chandini <i>et al</i> (2008)

<i>Laminaria setchellii</i>	Methanol	1.84 (μ g gallic acid equivalents/g extract)	(Yuan <i>et al.</i> , 2006)
<i>Colpomenia sinuosa</i>	Acetone/water	0.19(mg tannic acid equivalent/g dried algae)	This study
Red seaweeds			
<i>Palmaria palmata</i>	Methanol	12.8 (μ g gallic acid equivalents/g extract)	(Yuan <i>et al.</i> , 2006)
<i>Porphyra spp</i>	Ethanol	0.88(mg catechin equivalent/g dried algae)	(Kuda <i>et al.</i> , 2005)
<i>Gracilaria edulis</i>	Aquaus Methanol	(3.98 mg gallic acid / g dried algae)	(Ganesan <i>et al.</i> , 2008)
Green seaweeds			
<i>Chaetomorpha sp</i>	Acetone / water	0.56 (mg tannic acid equivalent/g dried algae)	This study

می‌کند (Wang *et al.*, 2009). در مطالعه Wang و

همکاران (۲۰۰۹) نیز که بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی چندین گونه جلبک دریایی ایسلند انجام شد حلل استون در ترکیب با آب جهت استخراج ترکیبات فنولی از بیشتر گونه‌ها بالاترین تأثیر را از خود نشان داد. زیرا استون می‌تواند از تشکیل کمپلکس پروتئین-پلی‌فنول در طول استخراج جلوگیری کرده و حتی باندهای هیدروژنی تشکیل شده بین گروه‌های پلی‌فنول و گروه کربوکسیل پروتئین را بشکند و از این جهت بتواند موثرترین حلل برای استخراج این ترکیبات باشد (Wang *et al.*, 2009). سطوح ترکیبات فنولی در بین دو گونه اختلاف معنی‌داری نشان داد که می‌تواند به تفاوت‌های گونه‌ای و ساختارهای آن‌ها بستگی داشته باشد. در بررسی که توسط O'Sullivan و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر پنج گونه جلبک قهقهه‌ای انجام شد میزان فنول کل به طور قابل ملاحظه‌ای به نوع گونه جلبکی وابسته بود. در واقع محتوای فنول کل حتی در گونه‌های مشابه می‌تواند بسیار متفاوت باشد و بستگی به اقلیم کشور، آب و هوای میزان نور خورشید و جایگاهی که در ساحل دارند داشته باشد. به طور مثال سطوح فنول کل با افزایش دمای محیط در بعضی گونه‌ها افزایش پیدا کرد که برای جلوگیری از استرس وارد شده توسط محیط می‌باشد.

۴. بحث و نتیجه گیری

ترکیبات فنولی از جمله آنتی‌اکسیدان‌های بسیار مهم بوده که به سبب قابلیتی است که در اهدای یک اتم هیدروژن یا الکترون برای تشکیل محصولات پایدار از رادیکال‌ها دارند (Hajimahmoodi *et al.*, 2010). این گروه از ترکیبات به طور قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها نقش دارند (O'Sullivan *et al.*, 2011). داده‌های بدست آمده در آزمایش‌های اولیه و پیش‌تست نشان داد که حلل‌های آلی با نسبت٪ ۳۰ جهت ادامه روند آزمایش‌ها کارایی بالاتری را در استخراج ترکیبات فنولی داشته است، در واقع این سیستم حلالی غشاهای سلولی را تخریب کرده و در عین حال به طور همزمان موجب افزایش انحلال ترکیبات فنولی در حلل استخراج می‌شود. دیگر نسبت‌ها در هر دو گونه میزان فنول کمتری را نشان داد. به همین دلیل از این نسبت حلل/آب (٪ ۳۰) آلی) برای ادامه آزمایش‌ها و روندهای استخراج استفاده شد. اما در آزمایش میزان ترکیبات فنولی نتایج نشان داد افزودن آب به حلل آلی تا حدود خاصی باعث افزایش کارایی استخراج ترکیبات فنولی توسط حلل‌های استخراج شده است که این ممکن است به دلیل ماهیت قطبی ترکیبات فنولی باشد که قابلیت انحلال این ترکیبات را در محیط‌های قطبی فراهم

داده است که روندی مشابه با نتایج ما داشت. در واقع نتایج نشان دهنده این مطلب می‌باشد که با توجه به قطبیت نسبیاً بالای حلال مтанول در ترکیب با آب، ممکن است ترکیباتی با ماهیت قطبی و تاحدی غیرقطبی علاوه بر ترکیبات فنولی نیز درگیر در فعالیت آنتیاکسیدانی و قدرت کاهندگی عصاره مtanولی استخراج شده باشند.

آزمایش فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH به طور گستردۀ ای برای ارزیابی فعالیت آنتیاکسیدانی یک ماده مورد استفاده قرار می‌گیرد. قابلیت یک ترکیب برای جذب رادیکال DPPH بستگی به قابلیت آن‌ها برای به اشتراک‌گذاری با الکترون‌های غیرجفتی یک رادیکال بستگی دارد (Park *et al.*, 2004). در جلبک فنول کل قابلیت جذب رادیکال بالاتری داشتند که احتمالاً به این دلیل است که پلیفنول‌های جلبکی ترکیبات پایه‌ای برای ویژگی آنتیرادیکالی عصاره می‌باشند. در واقع اثر معنی‌دار قطبیت حلال، بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت جذب رادیکال آزاد مشاهده شد. اگرچه بسیاری از مطالعات ارتباط بین میزان فنول کل و فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH را گزارش کرده‌اند که با افزایش میزان فنول کل فعالیت جذب رادیکال آزاد افزایش پیدا می‌کند (Heo *et al.*, 2005). اما در عین حال Heo و همکاران گزارش کرده‌اند که با افزایش میزان فنول کل در برخی از عصاره‌های جلبک‌های قهقهه‌ای مورد مطالعه، میزان فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH کاهش پیدا کرد که نشان دهنده‌ی این مفهوم می‌باشد که ترکیباتی با وزن

گزارشات متعددی وجود دارد که بر استفاده از چندین آزمایش آنتیاکسیدانی برای سنجش ویژگی‌های آنتیاکسیدانی یک عصاره تأکید کرده‌اند. زیرا ممکن است یک آزمایش به تنها یک نتواند منعکس‌کننده قدرت آنتیاکسیدانی یک ماده بوده و در شرایط مختلف نتایج مشابهی از نمونه را در اختیار ندهد (Blanc *et al.*, 2011). آزمایش FRAP یا قدرت کاهندگی آهن توانایی یک ترکیب آنتیاکسیدانی را برای کاهش اکسنده فریک (Fe³⁺) به یک ترکیب فروس (Fe²⁺) توسط انتقال یک الکترون اندازه‌گیری می‌کند و این قابلیت ترکیب را برای کاهش رادیکال‌های فعال نشان می‌دهد (Su *et al.*, 2009). به ارتباط بین فعالیت آنتیاکسیدانی عصاره و قدرت کاهندگی در بعضی مقالات اشاره شده است (Kumar *et al.*, 2008)؛ عصاره استونی و عصاره آبی به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین میزان قدرت کاهندگی آهن را نشان دادند که نتایج ما با مطالعه Ganesan و همکاران (۲۰۱۱) که بر فعالیت آنتیاکسیدانی سه گونه جلبک سبز انجام دادند که استون و آب به ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت را نشان دادند مشابههایی را نشان داد. در واقع خواص کاهندگی عصاره عموماً در ارتباط با حضور کاهنده‌ها در عصاره‌ها بوده که عمل آنتیاکسیدانی این کاهنده‌ها بر اساس شکست زنجیره‌ی رادیکال آزاد توسط اهدای یک اتم هیدروژن و تشکیل محصولات پایدار می‌باشد (Ganesan *et al.*, 2011). در بررسی که توسط Kumar و همکاران (۲۰۰۸) بریک نوع جلبک خوراکی (*alvarezii Kappaphycus*) صورت گرفت نیز گزارش شد که مtanول در مقایسه با حلول‌های اتانول، آب و هگزان قدرت کاهندگی بالاتری را نشان

فعالیت آنتیاکسیدانی به شدت به فنولها و رنگدانه‌هایی فوکوگزانتین ارتباط دارد. توکوفرولها و کارتوئیدها نیز می‌توانند دهنده‌ی هیدروژن به رادیکال آزاد باشند و فعالیت آنتیاکسیدانی عصاره‌های جلبکی Airanthi *et al.*, 2011). پلی‌ساکاریدهایی که به طور فراوان در جلبک‌های قهقهه‌ای وجود دارند مثل آلتزینات‌ها، فوکان‌ها و لامینارین فیبرهای محلول در آب بوده که ویژگی‌های زیست‌فعال مختلفی از جمله فعالیت آنتیاکسیدانی نشان می‌دهند (Ahn *et al.*, 2004).

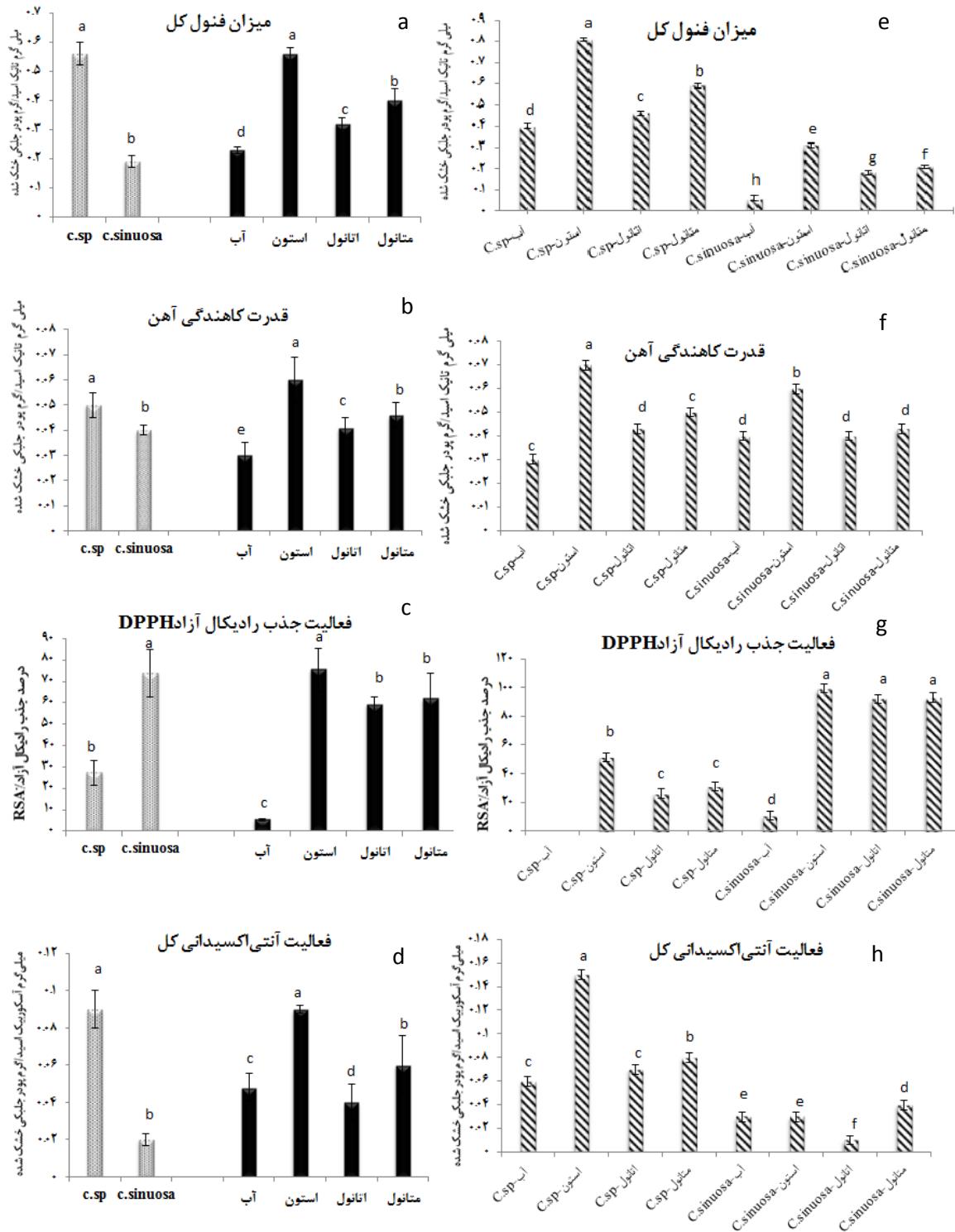
ماکروجلبک‌های دریایی منبعی غنی از آنتیاکسیدان‌های طبیعی بوده و این پتانسیلی را برای کاربرد آن‌ها در محصول‌های غذایی و دارویی به وجود می‌آورد. در این مطالعه عصاره‌های گونه جلبک سبز *Chaetomorpha sp* دارای فعالیت آنتیاکسیدانی بالاتری بود. این گونه بالاترین سطوح میزان فنول کل را شامل می‌شد و از قدرت کاهنده‌ی آهن و فعالیت آنتیاکسیدانی کل بیشتری برخوردار بود. اما عصاره گونه قهقهه‌ای *Colpomenia sinuosa* قدرت جذب رادیکال آزاد بالاتری را نشان داد که احتمالاً به دلیل شرکت دیگر ترکیبات علاوه بر ترکیبات فنولی در فعالیت جذب رادیکال عصاره می‌باشد. در عین حال استفاده از حللهای مختلف تأثیر معنی‌داری در استخراج ترکیبات آنتیاکسیدانی عصاره‌ها در هر دو گونه جلبک نشان داد. این مطالعه به عنوان یک بررسی اولیه می‌تواند جهت استفاده از جلبک‌های دریایی به منظور توسعه و تولید محصولات غنی از ترکیبات فنولی، برای درمان احتمالی بیماری‌های مرتبط با استرس‌های

مولکولی پایین مثل پلی‌ساکاریدها، رنگدانه‌هایی چون کلروفیل و کارتینوئید، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و پپتیدها احتمالاً در این فعالیت تأثیرگذار هستند. در مطالعه Cox و همکاران (۲۰۱۰) نیز که بر فعالیت آنتیاکسیدانی ۶ گونه جلبک انجام شد میزان فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH جلبک قهقهه‌ای با وجود اینکه میزان فنول کل کمتری نسبت به جلبک‌های سبز و قرمز داشتند، بالاتر گزارش شد که نشان دهنده نقش دیگر ترکیبات در فعالیت آنتیاکسیدانی جلبک می‌باشد. در استنباط فعالیت کمتر عصاره‌های آبی می‌توان گفت که احتمالاً رادیکال آزاد DPPH در حللهایی با مقادیر بیش از حد آب یا الكل دچار انعقاد شده و تهشین می‌شود و بدین سبب از دسترنس واکنش‌های شیمیایی دور می‌گردد و موجب کاهش فعالیت جذب رادیکال در عصاره‌های آبی می‌گردد (Karadag *et al.*, 2009). بالاترین فعالیت جذب رادیکال آزاد را در مطالعه Ganesan و همکاران (۲۰۰۸) در عصاره آبی و کمترین فعالیت را در حللهایی گزارش شد.

در تعیین فعالیت آنتیاکسیدانی کل روش فسفومولیبدنوم، مولیبدنوم VI (Mo^{6+}) به فرم ترکیب فسفات/مولیبدنوم V ($Mo^{5+}V$) سبزرنگ کاهش پیدا می‌کند (Ganesan *et al.*, 2008). نتایج ما نشان داد روندی مشابهی در مورد میزان فنول کل و فعالیت آنتیاکسیدانی کل مشاهده می‌شود. Fan و همکاران آنتیاکسیدانی تداخل دیگر ترکیباتی که در عصاره خام وجود دارند را نباید نادیده گرفت (Fan *et al.*, 2011).

تکمیلی را، فراسوی دیگر محققان قرار می‌دهد.

اکسیداتیو در بخش انسانی مورد استفاده قرار گیرد. اما قطعاً این نتایج کافی نبوده و نیاز این مهم به اطلاعات



شکل ۲. نمودارهای مقایسه‌ای اثر گونه و حلال به طور جداگانه (a-d): میزان فنول کل (a)، قدرت کاهندگی آهن (b)، فعالیت جذب رایکال آزاد DPPH (c)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (d). نمودارهای مقایسه‌ای اثر همکنش حلال و گونه به صورت توازن (e-h): میزان فنول کل (e)، قدرت کاهندگی آهن (f)، فعالیت جذب رایکال آزاد DPPH (g)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (h).

which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. Food Chem. 124: 195-202.

Ganesan, K., Kumar, K. S., and Rao, P. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, Enteromorpha from Okha, Northwest coast of India. Innov Food Sci Emerg. 12: 73-78.

Ganesan, P., Kumar, C. S., and Bhaskar, N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. Bioresource Technol. 99: 2717-2723.

Gupta, S., and Abu-Ghannam, N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends Food Sci Tech. 22: 315-326.

Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., and Nafissi-Varcheh, N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. J Appl Phycol. 22: 43-50.

Heo, S., Park, E. J., Lee, K. W., and Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. Bioresource Technol. 96: 1613-1623.

Karadag, A., Ozcelik, B., and Saner, S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. Food Anal Method. 2: 41-60.

Keyrouz, R., Abasq, M. L., Bourvellec, C. L., Blanc, N., Audibert, L., ArGall, E., et al. 2011. Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. Food Chem. 126: 831-836.

Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H., and Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of

منابع

- Ahn, C., Jeon, Y. J., Kang, D. S., Shin, T. S., and Jung, B. M. 2004. Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytoniphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. Food Res Int. 37: 253-258.
- Airanthy, M. K. W. A., Hosokawa, M., and Miyashita, K. 2011. Comparative Antioxidant Activity of Edible Japanese Brown Seaweeds. J Food Sci. 76: 104-111.
- Blanc, N., Hauchard, D., Audibert, L., and Ar Gall, E. 2011. Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. An electrochemical approach. Talanta. 84: 513-518.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci Technol. 28: 25-30.
- Chandini, S. K., Ganesan, P., and Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chem. 107:707-13.
- Chew, Y. L., Lim, Y., Omar, M., and Khoo, K. S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT- Food Sci Technol. 41: 1067-1072.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N., and Gupta, S. 2010. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. Int Food Res J. 17: 205-220.
- Fan, D., Hodges, D. M., Zhang, J., Kirby, C., Ji, X., Locke, S., et al. 2011. Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.)

- Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal Biochem.* 269: 337-341.
- Ruberto, G., Baratta, M. T., Biondi, D. M., and Amico, V. 2001. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus; *Cystoseira*, in a micellar model system. *J Appl Phycol.* 13: 403-407.
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Martins, J. T., Quintas, M. A. C., Ferreira, A., Teixeira A., et al. 2011. Antioxidant Potential of Two Red Seaweeds from the Brazilian Coasts. *J Agr Food Chem.* 59: 5589-5594.
- Su, X. Y., Wang, Z. Y., and Liu, J. 2009. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chem.* 117: 681-686.
- Taga. M., silvia, M. E. 1984. Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. *JAOCS*, 61.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., and Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* 116: 240-248.
- Yuan, Y. V., Walsh, N. A. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem Toxicol.* 44:1144-50.
- four edible algae harvested in the *Noto Peninsula*, Japan. *J Food Compos Anal.* 18: 625-633.
- Kumar, K. S., Ganesan, K., and Rao, P. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. *Food Chem.* 107: 289-295.
- Li, Y., Qian, Z. J., Ryu, B., Lee, S. H., Kim, M. M., and Kim, S. K. 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorgan Med Chem.* 17: 1963-73.
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., and Ismail, N. 2009. Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chem.* 116: 306-312.
- Meenakshi, S., Umayaparvathi, S., Arumugam, M., and Balasubramanian, T. 2012. In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2: S66-S70.
- O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y., O'Grady, M. N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy et al. 2011. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chem.* 126: 1064-1070.
- Park, P. J., Shahidi, F., Jeon, Y. J. 2004. antioxidant activities of enzymatic extracts from an edible seaweed *Sargassum horneri* using ESR spectrometry. *J Food Lipids.* 11: 15-27.

In vitro antioxidative activity and total phenolic content determination of two Persian Gulf seaweed species *Chaetomorpha sp* and *Colpomenia sinuosa*

P. Safari¹, M. Rezaei^{1*}, A.R. Shaviklo¹, A. Garmsiri¹, A. Babakhani²

1. Department of Seafood processing, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University,

2. Faculty of natural resources, Guilan University

Abstract

Natural antioxidants are more safe and healthy than synthetics antioxidants. The natural antioxidants aren't limited to terrestrial sources. It's documented that marine seaweeds are a rich source of natural antioxidant components. In this study, the antioxidant potential of two species namely *Chaetomorpha sp* and *Colpomenia sinuosa* and effect of different solvents on antioxidant compounds extraction were studied. The algal materials were extracted by conventional solvent extraction during 24 hours in room temperature (26-28°C) using acetone, ethanol, methanol (30/70%) and water (100%). Total phenolic contents, ferric reducing power, DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity were measured in different extracts. The data showed acetone extracts have more potential to extraction antioxidant and polyphenolic compounds in comparison with other treatments. Also, it's revealed that *Chaetomorpha sp* had the highest phenolic contents, ferric reducing power and total antioxidant capacity but lower radical scavenging activity than *Colpomenia sinuosa*. The difference in antioxidant compounds extraction can be related to the solvents type, target compounds and algal species. These algae can be applied in food and pharmaceutical industries as natural antioxidants sources.

Keywords: Phenolic compounds, ferric reducing power, natural antioxidant, green algae (*Chaetomorpha sp*), brown algae (*Colpomenia sinuosa*)

* Corresponding author: rezai_ma@modares.ac.ir