فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره اول، بهار ۱۳۹۶

بررسی کیفی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*

زهرا سالاری[۱]، ایمان سوری‌نژاد[۲،۳]*، ملیکا ناظمی[۴]، مرتضی یوسف‌زادی[۵،۶]

تاریخ دریافت: مهر ۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۹۵

چکیده

خیارهای دریایی دارای انواع مختلفی از ترکیبات طبیعی و مواد زیست‌فعال هستند. ساپونین مهم‌ترین و فراوان‌ترین متابولیت ثانویه در خیارهای دریایی است که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی و بیولوژیکی است. هدف از این مطالعه استخراج، تایید حضور و بررسی کیفی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni* بود. ساپونین تخلیص شده از دیواره بدن این خیار دریایی طی فرآیند حرارت دادن جدا شد. تست توانایی تشکیل کف، کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا، حضور ساپونین‌ها را در خیار دریایی تایید کرد. در تعیین اندیس کف کنندگی ساپونین‌ها، با افزایش حجم عصاره، ارتفاع کف در مدت زمان ۱۵ و ۶۰ دقیقه افزایش یافت و در بالاترین حجم عصاره بیشترین کف تشکیل شد. کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که طی فرایند حرارت دادن، سایر ترپنوئیدها حذف شد و آنچه باقی ماند ساپونین خالص با R_f ۰/۸۴ بود که استروساپونین است.

واژگان کلیدی: *ساپونین، کروماتوگرافی لایه نازک، خیار دریایی، خلیج فارس،* Stichopus hermanni.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۳- استادیار گروه فناوری‌های نوین، پژوهشکده منطقه‌ای جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۴- استادیار پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
۵- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۶- دانشیار گروه فناوری‌های نوین، پژوهشکده منطقه‌ای جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
* نویسنده مسئول: Sourinejad@hormozgan.ac.ir

مقدمه

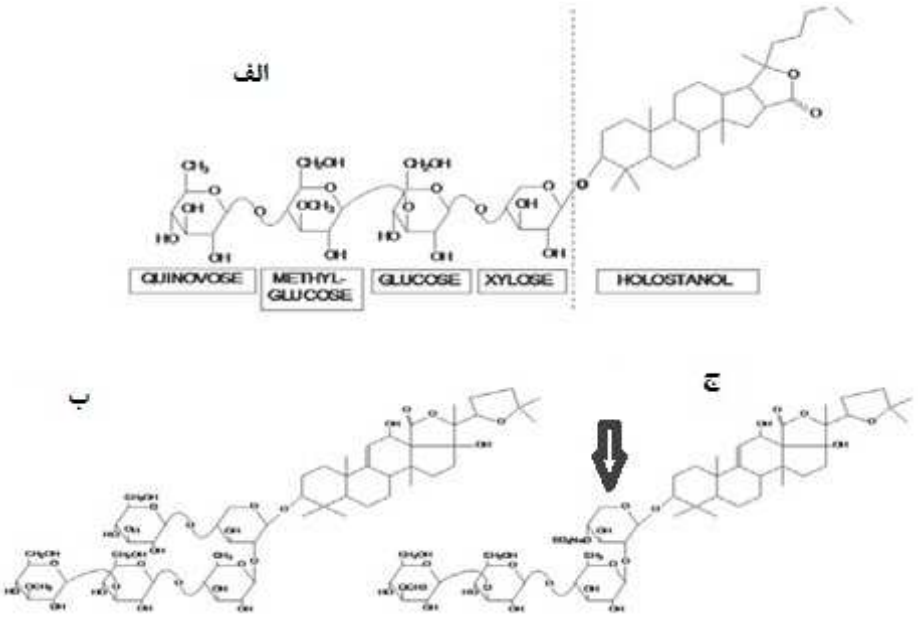
زیست‌فناوری دریایی یکی از راه‌های توسعه و پیشرفت تولید محصولات جدید از جانداران دریایی است. این فرآورده‌ها در زمینه‌های متنوعی مانند سلامت و بهداشت (ترکیبات زیست‌فعال با کاربرد دارویی)، غذا و انرژی (آنتی‌اکسیدان‌ها) و انرژی صنعتی (سوخت زیستی) کاربرد دارند (Osinga et al., 1999). در سال‌های اخیر ترکیبات زیست‌فعال بسیاری از جانوران دریایی متنوعی استخراج شده است و جستجو برای کشف متابولیت‌های جدید از این موجودات منجر به جداسازی حدود ۱۰،۰۰۰ متابولیت شده است که بسیاری از آن‌ها در زمینه‌های داروسازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Mokhlesi et al., 2012). بیشتر این ترکیبات زیست‌فعال از اسفنج‌های دریایی، عروس‌های دریایی، مرجان‌ها، خزه‌شکلان، نرم‌تنان، خارپوستان، تونیکات‌ها و سخت‌پوستان جداسازی شده‌اند (Bhakuni and Rawat, 2005). خیارهای دریایی گروه بزرگی از آبزیان را تشکیل می‌دهند که از نظر رده‌بندی جزء شاخه خارپوستان[1] و رده Holothuroidea محسوب می‌شوند. این جاندار بدنی چرم مانند دارد و بیشتر در کف دریاها و یا مناطق بین جزر و مدی زندگی می‌کند. فعالیت‌های زیستی خیارهای دریایی شامل خاصیت ضدسرطانی، ضدویروس، ضدانعقاد، ضدفشار خون، ضدالتهاب، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتصلب شرایین، ضدتومور و تسریع کننده بهبود زخم است (Murray et al., 2001; Tian et al., 2005; Datta et al., 2015). حضور موادی مانند ساپونین[2]، سولفات کندرویتین[3]، گلوکز آمینوگلیکان[4]، پلی‌ساکارید سولفاته[5]، گلیکوپروتئین[6]، گلیکواسفنگولیپید[7] و اسیدهای چرب ضروری در خیار دریایی منشا وجود چنین خواص زیستی در آن‌ها شده است (Bordbar et al., 2011). اگرچه خیار دریایی شامل انواع مختلفی از ترکیبات طبیعی است، ساپونین‌ها مهم‌ترین و فراوان‌ترین متابولیت ثانویه در این موجودات هستند (Caulier et al., 2011). ساپونین‌ها گلیکوزیدهای با وزن مولکولی بالا هستند که دارای گروه قندی متصل به گروه آگلیکون تری‌ترپن یا

1- Echinodermata

2- Saponin
3- Chondroitin Sulfates
4- Glycosaminoglycan
5- Sulfated Polysaccharides
6- Glycoproteins
7- Glycosphingolipids

استروییدی هستند (Paul and Ritson-Williams, 2008). بسیاری از ساپونین‌ها خواص پاک کنندگی دارند. آن‌ها کشش سطحی محلول‌های آبی را کاهش می‌دهند و هنگامی‌که در تماس با آب قرار می‌گیرند کف پایدار تشکیل می‌دهند. ساپونین‌ها در بسیاری از داروهای سنتی و گیاهان دارویی به ویژه در مشرق زمین یافت می‌شوند و در نتیجه پژوهش‌های زیادی برای تعیین ویژگی‌ها و خواص دارویی و زیستی آن‌ها انجام شده است (Hostettmann and Marston, 1995; Van Dyck et al., 2010). ساپونین‌ها دارای طیف گسترده‌ای از خواص دارویی، قلبی و عروقی، ایمنی، ضدآسم، ضداگزما، ضدالتهاب، ضدتورم مفاصل، آنتی‌اکسیدان، ضددیابت، ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدسرطان، ضدقارچ، همولیتیک و کاهش دهنده کلسترول هستند (Hostettmann and Marston, 1995; Dong et al., 2008; Sarhadizadeh et al., 2014). ساپونین‌ها را معمولا از گیاهان عالی استخراج می‌کنند ولی امروزه استفاده از جانوران کمتر تکامل یافته دریایی برای تهیه ساپونین نیز مورد توجه قرار گرفته است و تاکنون در شاخه خارپوستان و به ویژه در گونه‌هایی از خیار دریایی و ستاره دریایی[1] نمونه‌هایی از این ترکیبات یافت شده‌اند (Hostettmann and Marston, 1995). ساپونین خیارهای دریایی به عنوان گلیکوزیدهای تری‌ترپن متشکل از یک زنجیره الیگوساکارید و هولوستان- ۳b- اُل[2] توصیف شده است (شکل ۱- الف؛ Caulier et al., 2011). ساپونین‌های هولوتوروئیده (شکل‌های ۱- ب و ۱- ج) شامل یک پیوند دوگانه D در آگلیکون و یک زنجیره کربوهیدراتی با بیش از ۶ واحد قند شامل زایلوز، گلوکز، ۳-O- متیل گلوکز و کینووز است و می‌تواند فقط یک شاخه شود. برخی از این ساپونین‌ها می‌توانند تنها در سطح زایلوز سولفاته باشند (شکل ۱- ج). ساختار آن‌ها به نحوی است که متشکل از سه تری‌ترپن گلیکوزیدی است (شکل ۱). تاکنون ۵۹ تری‌ترپن گزارش شده است. با وجود این که چندین ساپونین در این خانواده مشترک هستند برخی از آن‌ها بسیار اختصاصی هستند. این تفاوت‌های اختصاصی بستگی به حضور و یا عدم حضور گروه سولفات متصل به زنجیره کربوهیدراتی ساپونین دارد (Caulier et al., 2011).

1 Starfish
2- Holostane-3b-ol



شکل ۱: ساختار مولکولی (الف): یک ساپونین متشکل از آگلیکون هولوستان و یک زنجیره گلیکوزیدی خطی که از چهار مونوساکارید رایج موجود در ساپونین خیار دریایی تشکیل شده است. (ب) ساپونین هولوتوروئیده غیر سولفاته؛ (ج) ساپونین هولوتوروئیده سولفاته (Bergmann and Feeney, 1950)

ترکیبات گلیکوزیدی ساپونین متشکل از یک هسته استروئید (۲۷ کربنه) و یا هسته تری‌ترپنوئید (۳۰ کربنه) با یک یا چند شاخه قندی است (Hostettmann and Marston, 1995; Klita et al., 1996). خلیج فارس یک محیط منحصر به فرد با تنوع زیستی غنی است که این محیط میزبان بسیار مناسبی جهت پژوهش بر روی فعالیت‌های زیستی دریایی محسوب می‌شود. با وجود مطالعات متعدد در مورد اثرات زیستی متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از گونه‌های مختلف خیار دریایی، اطلاعات کمی در مورد ترکیبات زیست‌فعال جدا شده از خیار دریایی خلیج فارس وجود دارد و این ترکیبات هنوز به خوبی شناسایی نشده‌اند. بنابراین هدف از این مطالعه، استخراج ساپونین برای اولین بار از خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni* و مطالعه کیفی ساپونین استخراج شده به روش کروماتوگرافی لایه نازک بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و عصاره‌گیری از خیار دریایی

خیار دریایی گونه *Stichopus hermanni* از عمق ۵ تا ۱۲ متری در اطراف جزیره لارک واقع در خلیج فارس جمع‌آوری شد و به پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انتقال داده شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه شسته شد. سپس تخلیه حفره شکمی صورت گرفت و دیواره بدن به قطعات کوچک برش زده شد. قطعات عضلانی خیار دریایی به منظور خشک کردن کامل، به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر (FDB-5503، Operon، کره جنوبی) قرار گرفت و بعد از خشک کردن کامل، پودر شدند. نمونه‌های پودر شده ابتدا با الکل اتانول ۷۰٪ (Merck، آلمان) در دمای آزمایشگاه به مدت ۷۲ ساعت عصاره‌گیری شدند. بعد از این زمان به منظور تهیه عصاره خالص و بدون مواد باقیمانده، عصاره تهیه شده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد و سپس به منظور حذف کامل حلال، تحت فشار کم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از روتاری (Laborota 4000، Heidolph، آلمان) با ۱۴۵ دور در دقیقه تغلیظ شد.

استخراج ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی

به منظور استخراج ساپونین، دو گرم از عصاره تغلیظ شده با متانول ۹۰٪ (Merck، آلمان) و ان- هگزان (Merck، آلمان) به نسبت برابر به مدت ۲۴ ساعت رقیق شد. نمونه حاصل از حلال، بعد از تبخیر در خلأ با ان- بوتانول (Merck، آلمان) مخلوط شد و سپس برای جداسازی فاز مورد نظر، محلول حاضر دکانته شد. در نهایت فازهای حاصل از دکانته برای حذف حلال تحت خلأ قرار گرفتند. به منظور بررسی حضور ساپونین بخشی از فاز ان- بوتانولی حاصل از دکانته به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بخش دیگر بدون حرارت دادن بررسی شد (Van Dyck et al., 2010).

بررسی مقدار ساپونین استخراج شده

برای بررسی مقدار ساپونین استخراج شده بخشی از فاز ان- بوتانولی که حرارت داده شده بود (همان‌طور که در بالا توضیح داده شد) و بخش دیگر از فاز ان- بوتانولی که حرارت داده نشده بود در روتاری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و ۱۴۵ دور در دقیقه تبخیر شد و میزان ساپونین باقی مانده آن با استفاده از ترازو وزن شد.

مطالعه کیفی ساپونین به روش کروماتوگرافی

مطالعه کیفی ساپونین حرارت دیده و حرارت ندیده به دو روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) انجام شد. ساپونین استخراج شده روی صفحات آلومینیومی (۲۰×۲۰ سانتی‌متر) پوشیده شده با یک لایه سیلیکاژل 60F254 (Merck، آلمان) به عنوان فاز ثابت قرار داده شد. صفحات درون تانک کروماتوگرافی که قبلا درون آن مخلوط متانول و کلروفورم (۱۰:۹۰) به عنوان فاز متحرک برای اشباع شدن ریخته شده بود، قرار داده شدند (Wagner et al., 1984). برای حضور لکه‌های ساپونینی، صفحات TLC بعد از خشک شدن با محلول سولفوریک اسید و وانیلین به شکل محلول ۵ درصد سولفوریک اسید در اتانول و محلول یک درصد وانیلین اسپری شدند. در نهایت صفحات ۱۰ دقیقه در آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا رنگ لکه‌ها در نور مرئی آشکار شود (Wagner et al., 1984). پس از ظهور لکه‌ها R_f هر یک از آن‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد:

رابطه ۱:

R_f = (فاصله لکه از مبدا) / (فاصله حلال از مبدا)

همچنین نمونه‌ای از ترکیب جدا شده به آزمایشگاه جامع دانشگاه شهید بهشتی ارسال شد تا با دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) مورد شناسایی قرار گیرد.

تعیین اندیس کف کنندگی ساپونین

یک گرم نمونه پودر شده (اندازه ۰/۸ میلی‌متر) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب جوش حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. پس از سرد شدن، مخلوط حاصل صاف شد و درون لوله‌های آزمایش (ارتفاع ۱۶ سانتی‌متر، قطر ۱۶ میلی‌متر) محلول‌هایی با رقت‌های یک تا ده میلی‌گرم در میلی‌لیتر در سه تکرار تهیه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه در جهت طولی هم‌زده شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در حالت سکون قرار داده شد و در نهایت ارتفاع کف حاصل اندازه‌گیری شد (شکل ۲؛ World Health Organization, 1998). اگر کف مذکور نیم ساعت باقی بماند دارای ساپونین متوسط (++) و اگر به همین صورت یک ساعت باقی بماند مقدار ساپونین قوی (+++) خواهد بود (Tiwari et al., 2011).

نتایج

در این پژوهش مقدار ساپونین استخراج شده طی روش حرارت دادن و حرارت ندادن با یکدیگر مقایسه شد. میزان ساپونین استخراج شده از دو گرم عصاره تهیه شده با اتانول ٪۷۰ طی حرارت دادن ۱/۱۷ گرم و میزان ساپونین حرارت داده نشده ۱/۳۷ گرم بود.

کروماتوگرافی لایه نازک عصاره‌ها (شکل ۲) برای بررسی کیفی ساپونین‌های حرارت ندیده، سه لکه ساپونینی را در محدوده R_f ۰/۵۵ تا ۰/۷۴ به رنگ بنفش تا بنفش تیره آشکار کرد. R_f و شدت رنگ لکه‌های ساپونینی حرارت ندیده در جدول ۱ مشخص شده است.

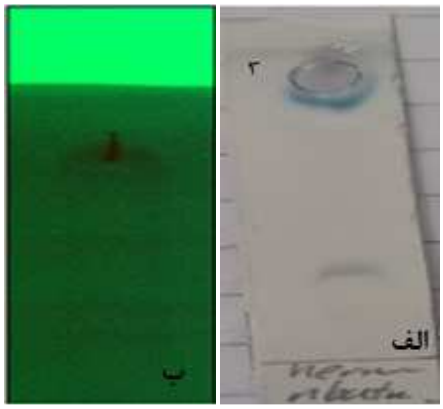
شکل ۲: کروماتوگرام مربوط به ساپونین‌های حرارت داده نشده در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*

جدول ۱: مشخصات مربوط به لکه‌های ساپونینی حرارت ندیده در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*

شماره لکه	R_f	رنگ لکه	شدت رنگ لکه
۱	۰/۷۴	بنفش	+
۲	۰/۳۴	بنفش	+
۳	۰/۵۵	بنفش تیره	++

در بررسی کیفی ساپونین حرارت دیده به روش کروماتوگرافی لایه نازک، همان طور که در کروماتوگرام مربوط (شکل ۳- الف) مشاهده می‌شود یک لکه ساپونینی با R_f ۰/۸۴ دیده شد. همچنین تست ساپونین استخراج شده، توسط دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا که از نمونه شاهدِ مشخص و اطلاعات ذخیره شده در حافظه برای تایید حضور مواد استفاده می‌کند بیانگر تایید حضور ساپونین (شکل ۳- ب) در خیار دریایی مورد مطالعه در این پژوهش با توجه به R_f به دست آمده بود.

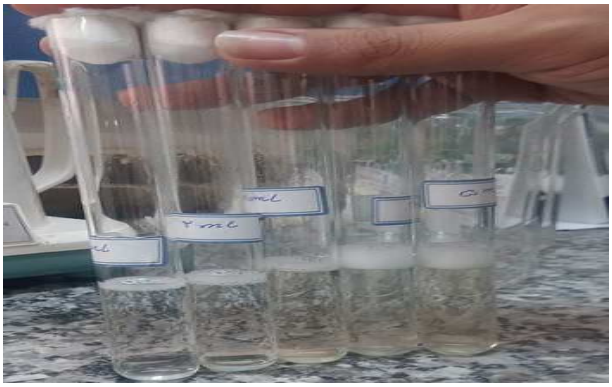
کف ایجاد شده در مدت زمان ۱۵ و ۶۰ دقیقه در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni* به ترتیب در اشکال ۴ و ۵ نشان داده شده است.



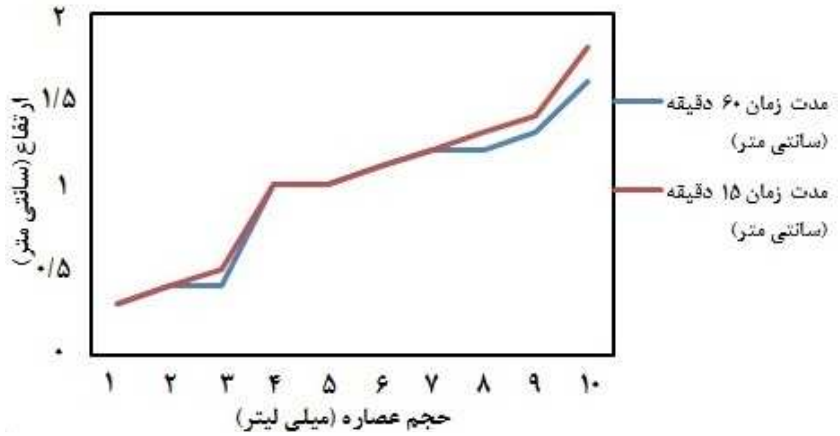
شکل ۳: کروماتوگرام مربوط به ساپونین حرارت دیده در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*. الف) روش TLC. ب) روش HPTLC.

شکل ۴: کف ایجاد شده در مدت زمان ۱۵ دقیقه در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*

در تعیین اندیس کف کنندگی ساپونین‌ها، ارتفاع کف ایجاد شده پس از سپری شدن مدت زمان ۱۵ و ۶۰ دقیقه در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni* در شکل ۶ ارائه شده است.



شکل ۵: کف ایجاد شده در مدت زمان ۶۰ دقیقه در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*



شکل ۶: ارتفاع کف ایجاد شده بر اساس حجم عصاره در مدت زمان ۱۵ و ۶۰ دقیقه در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*

بحث

در طول چهار دهه گذشته تلاش‌های فراوانی برای کشف فعالیت‌های زیستی ترکیبات منابع دریایی انجام شده است. تعداد زیادی از این ترکیبات طبیعی سود بسیاری برای صنایع داروسازی و تجاری داشته که باعث افزایش تقاضا در صنایع داروسازی و غذایی شده است (Bordbar et al., 2011). در این میان ساپونین‌ها ترکیبات زیست‌فعال اصلی هستند که دارای طیف گسترده‌ای از

فعالیت‌های زیستی و اثرات درمانی بسیاری هستند. این ترکیبات در بسیاری از گونه های خیار دریایی وجود دارند (Hostettmann and Marston, 1995). به عنوان مثال Silchenko و همکاران (۲۰۰۸) در گونه‌های خیار دریایی از دریای مدیترانه، اقیانوس اطلس شمالی و اقیانوس آرام شمالی ساپونین را شناسایی کردند. در مطالعه حاضر، ساپونین تخلیص شده از خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni* با روش حرارت دادن با استفاده از حلال‌های آلی بررسی شد. از آنجا که کاربرد حلال‌های متعدد تاثیر معنی‌داری بر حذف ترکیبات زاید و افزایش میزان جداسازی ساپونین‌های استخراج شده دارند در این پژوهش از اتانول و ان- بوتانول استفاده شد که به میزان قابل توجهی ساپونین استخراج شد. احمد بیگی و صبورا در سال (۱۳۸۷) به منظور استخراج ترکیبات ساپونینی از ساقه غده‌ای گیاه نگونسار *Cyclamen coum* از سه حلال اتانول، دی اتیل اتر، و ان- بوتانول استفاده کردند که منجر به استخراج ٪۷/۸ ساپونین کل شد. نتایج همچنین نشان داد که میزان ساپونین استخراج شده در روش حرارت داده نشده بیشتر از حرارت داده شده، است که به علت تداخل ترکیبات ساپونینی و غیرساپونینی این میزان واقعی نیست و بنابراین روش حرارت دادن بهتر است زیرا ساپونین خالص‌تری استخراج می‌شود. بسیاری از ترکیبات طبیعی در دمای بالای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تخریب شده و از بین می‌روند اما ساپونین‌ها به دلیل ساختار قطبی بالا در این دما تغییر ساختار نمی‌دهد. بنابراین طی حرارت دادن سایر ترکیبات زیست‌فعال حذف شده اما ساپونین‌ها باقی می‌مانند (Muir et al., 2002; Caulier et al., 2011).

در مطالعه حاضر، کروماتوگرافی لایه نازک بخش حرارت ندیده، سه لکه ساپونینی را در محدوده R_f ۰/۵۵ تا ۰/۷۴ نشان داد که لکه شماره سه با R_f ۰/۷۴ به علت شدت رنگ بیشتر و حضور در هر دو روش استخراج، اصلی‌ترین ترکیب ساپونینی بود ولی طی حرارت دادن، سایر ترپنوئیدها حذف شدند و آنچه باقی می‌ماند ساپونین خالص با R_f ۰/۸۴ بود که از نوع استروساپونین است (Wagner et al., 1984). تشخیص ساپونین و نوع آن توسط دستگاه HPTLC و اطلاعات کتابخانه‌ای این دستگاه مورد تایید قرار گرفت، ضمن آن که در کروماتوگرافی کاغذی که به روش دستی انجام شد، R_f نیز نشان داد این ترکیب ساپونین است که با آنالیز دستگاهی انجام شده

تطابق داشت. کیهانی و همکاران (۱۳۹۴) ترکیبات ساپونینی ریشه گیاه چوبک را به روش عصاره‌گیری با امواج فراصوت در یک محدوده زمانی ثابت استخراج کردند که با افزایش دما بازده استخراج ساپونین‌ها افزایش یافت. در این ارتباط می‌توان گفت که به طورکلی افزایش دما با کاهش ویسکوزیته حلال و افزایش انرژی جنبشی، نفوذ حلال را به داخل بافت گیاهی افزایش می‌دهد و سرعت استخراج را بالا می‌برد. افزایش دما همچنین می‌تواند سبب باز شدن دیواره‌های سلولی شود که نتیجه آن در دسترس قرار گرفتن ترکیبات هدف است و در نتیجه کارایی استخراج افزایش می‌یابد (Pan et al., 2000). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۴) صورت گرفت، ساپونین خالص از خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* با حلال‌های آلی جدا شد و ستون HP-20 رزین برای خالص‌سازی بیشتر استفاده شد. نام ساپونین بر اساس فعالیت سطحی آن انتخاب شده است زیرا بسیاری از ساپونین‌ها خاصیت کف کنندگی دارند و در آب کف پایدار تولید می‌کنند. قابلیت ایجاد کف یکی از ویژگی‌های ساپونین است که با استفاده از آن می‌توان به احتمال حضور ساپونین در نمونه پی برد. با مشاهده کف پایدار در آزمون تعیین شاخص کف کنندگی، وجود ساپونین در بخش عضلانی خیار دریایی *Stichopus hermanni* ثابت شد. ارتفاع کف در لوله‌ها کمتر از یک، مساوی و یا بیشتر از یک سانتی‌متر بود. با افزایش حجم عصاره، ارتفاع کف پایدار ایجاد شده در لوله‌ها نیز افزایش یافت. از آنجا که کف ایجاد شده چندین ساعت باقی مانده بود، بنابراین ساپونین گونه مورد نظر قوی است. کرمیان و قاسملو (۱۳۹۴) وجود ساپونین را در بخش‌های هوایی و ریشه سه گونه گیاه از جنس گل ماهور *Verbascum* با انجام آزمون تعیین شاخص کف کنندگی و تشکیل کف پایدار به اثبات رساندند. نتایج همچنین نشان داد که با افزایش حجم عصاره، ارتفاع کف ایجاد شده در هر سه گونه افزایش یافت که موافق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بود.

در جمع‌بندی، نتایج مطالعه حاضر اثبات کننده وجود ساپونین در خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni* است. میزان ساپونین در این گونه که به وسیله حلال‌های اتانول و ان- بوتانول استخراج شد، به میزان کافی بود و خاصیت کف کنندگی پایدار داشت. با افزایش حجم عصاره ارتفاع کف افزایش یافت و در بالاترین حجم عصاره،

بیشترین کف تشکیل شد. کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا نشان داد که طی حرارت دادن سایر ترپنوئیدها حذف شد و آنچه باقی ماند ساپونین خالص از نوع استروساپونین بود.

منابع

احمد بیگی ز. و صبورا ع. ۱۳۸۷. مقایسه کارایی سه روش استخراج ساپونین از ساقه غده‌ای گیاه نگونسار (*Cyclamen coum*). فیزیک کاربردی، ۲۱(۲): ۳۸-۲۸.

کرمیان ر. و قاسملو ف. ۱۳۹۴. مطالعه محتوای ساپونین در بخش‌های هوایی و ریشه سه گونه از جنس *Verbascum* L. پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۸(۳): ۶۰۶-۵۹۶.

کیهانی و.، مرتضوی س.ع.، کریمی م.، کاراژیان ح. و شیخ الاسلامی ز. ۱۳۹۴. کاربرد امواج فراصوت در استخراج ترکیبات ساپونینی ریشه گیاه چوبک (*Acanthophyllum glandulosum*) بر پایه ویژگی‌های امولسیون کنندگی و کف‌زایی آن‌ها. پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۴(۴): ۳۴۲-۳۲۵.

Bergmann W. and Feeney R.J. 1950. The isolation of a new thymine pentoside from sponges1. Journal of the American Chemical Society, 72(6): 2809–2810.

Bhakuni D.S. and Rawat D.S. 2005. Bioactive Marine Natural Products. Springer, Netherlands. 382P.

Bordbar S., Anwar F. and Saari N. 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods- A review. Marine Drugs, 9(10): 1761–1805.

Caulier G., Van Dyck S., Gerbaux P., Eeckhaut I. and Flammang P. 2011. Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuriidae. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 31: 48–54.

Datta D., Talapatra S. and Swarnakar S. 2015. Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. International Letters of Natural Sciences, 7: 42–61.

Dong P., Xue C. and Du Q. 2008. Separation of two main triterpene glycosides from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei* by high-speed countercurrent chromate-graphy. Acta Chromatographica, 20: 269–276.

Hostettmann K. and Marston A. 1995. Chemistry and pharmaco-logy of natural product: Saponins. Cambridge University Press, UK. 286P.

Klita P.T., Mathison G.W., Fenton T.W. and Hardin R.T. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. Journal of Animal Science, 74(5): 1144–1156.

Mokhlesi A., Saeidnia S., Gohari A.R., Shahverdi A.R., Nasrolahi A., Farahani F., Khoshnood R. and Es'haghi N. 2012. Biological activities of the sea cucumber

Holothuria leucospilota. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 7(3): 243–249.

Muir A.D., Paton D., Ballantyne K. and Aubin A.A. 2002. Process for recovery and purification of saponins and sapogenins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). United States Patent, No.: US 6,355,249 B2. 21P.

Murray A.P., Muniain C., Seldes A.M. and Maier M.S. 2001. Patagonicoside A: A novel anti-fungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. Tetrahedron, 57(47): 9563–9568.

Osinga R., Tramper J. and Wijffels R.H. 1999. Marine bioprocess engineering: From ocean to industry. Trends in Biotechnology, 17(8): 303–304.

Pan X.J., Liu H.Z., Jia G.H. and Shu Y.Y. 2000. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Journal of Biochemical Engineering, 5: 173–177.

Paul V.J. and Ritson-Williams R. 2008. Marine chemical ecology. Natural Product Reports, 25(4): 662–695.

Sarhadizadeh N., Afkhami M. and Ehsanpour M. 2014. Evaluation bioactivity of a sea cucumber, *Stichopus hermanni* from Persian Gulf. European Journal of Experimental Biology, 4: 254–258.

Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Fedorov S.N., Stepanov V.G., Dong Z. and Stonik V.A. 2008. Constituents of the sea cucumber *Cucumaria okhotensis*. Structures of okhotosides B1–B3 and cytotoxic activities of some glycosides from this species. Journal of Natural Products, 71(3): 351–356.

Soltani M., Parivar K., Baharara J., Kerachian M.A. and Asili J. 2014. Hemolytic and cytotoxic properties of saponin purified from *Holothuria leucospilota* sea cucumber. Reports of Biochemistry and Molecular Biology, 3(1): 43–50.

Tian F., Zhang X., Tong Y., Yi Y., Zhang S., Li L., Sun P., Lin L. and Ding J. 2005. PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities in vitro and in vivo. Cancer Biology and Therapy, 4(8): 874–882.

Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. and Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extraction: A review. International Pharmaceutica Sciencia, 1(1): 98–106.

Van Dyck S., Gerbaux P. and Flammang P. 2010. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean. Marine Drugs, 8(1): 173–189.

Wagner H., Bladt S. and Zgainski E.M. 1984. Plant Drug Analysis (A Thin Layer Chromatography Atlas). Springer, Germany. 384P.

World Health Organization. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization, Switzerland. 122P.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 5, No. 1, Spring 2017

Qualitative survey of the extracted saponin from the Persian Gulf sea cucumber *Stichopus hermani*

Zahra Salari[1], Iman Sourinejad[2,3]*, Melika Nazemi[4], Morteza Yousefzadi[5,6]

Received: October 2016 Accepted: December 2016

Abstract

Sea cucumbers contain a wide range of natural and bioactive compounds. Saponin is the most important and abundant secondary metabolite in sea cucumbers which has a wide range of pharmaceutical and biological activities. The objective of this study was to extract the saponin from the Persian Gulf sea cucumber *Stichopus hermanni* and to survey it qualitatively. The purified saponin was extracted from the body wall of sea cucumbers during the heating procedure. Foam formation ability, thin layer chromatography, and high performance thin layer chromatography confirmed the presence of saponin in the sea cucumber. In determining the foam formation index, the foam height increased in the periods of 15 and 60 min with the increase of extract volume and in the case of the highest extract volume, the highest amount of foam was formed. Thin layer chromatography showed that during the heating procedure, the other terpenoids were removed and what was remained was the pure saponin with R_f 0.84 that is ester saponin.

Key words: *Saponin, Thin Layer Chromatography, Sea Cucumber, Persian Gulf,* Stichopus hermanni.

1- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Modern Technologies, Mangrove Forests Research Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
4- Assistant Professor in Persian Gulf and Oman Sea Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institution, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran.
5- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
6- Associate Professor in Department of Modern Technologies, Mangrove Forests Research Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
*Corresponding Author: Sourinejad@hormozgan.ac.ir