





دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی

جداسازی پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های مریم گلی ارغوانی

(*salvia Multicaulis*) و شناسایی ساختار آن.

نگارنده: طیبه زارع

اساتید راهنما:

دکتر کامبیز جهان بین

بهمن ۱۳۹۶



فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای طیبه زارع با شماره دانشجویی: ۹۴۰۸۶۲۴ رشته علوم و مهندسی صنایع غذایی - گرایش علوم مواد غذایی تحت عنوان جداسازی پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های مریم گلی ارغوانی (*salvia multicaulis*) و شناسایی ساختار آن که در تاریخ ۹۶/۱۱/۹ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: <u>خیلی خوب</u>) <input type="checkbox"/> مردود <input type="checkbox"/>			
نوع تحقیق: نظری <input type="checkbox"/> عملی <input checked="" type="checkbox"/>			
عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر کامبیز جهان بین		
۲- استاد راهنمای دوم			
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر حسین میرزایی مقدم		
۵- استاد ممتحن اول	دکتر حمید رضا صمد لویی		
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر احمد رجایی	استاد	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمد رضا عامریان
تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:
تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیر و تشکر

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم.
از استاد فاضل و اندیشمند جناب آقای دکتر **کامبیز جهان بین** به عنوان استاد راهنما که همواره نگارنده را مورد لطف و محبت خود قرار داده اند، کمال تشکر را دارم.

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به:

– محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه تلاشهای محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند و با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

به استادان فرزانه و فرهیخته ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند

خدایا توفیق خدمتی سرشار از شور و نشاط و همراه و همسو با علم و دانش و پژوهش جهت

رشد و شکوفایی ایران عزیز عنایت بفرما

تعهدنامه

اینجانب طیبه زارع دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه جداسازی پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های مریم گلی ارغوانی (*salvia multicaulis*) و شناسایی ساختار آن تحت راهنمایی دکتر کامبیز جهان بین متعهد می شوم..

تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .

- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

تاریخ ۹۶/۷/۲۹

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

چکیده

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی با وزن مولکولی ۹۵۸۰۰ دالتون و چرخش نوری ویژه $+136/3^{\circ}$ از ریشه های مریم گلی ارغوانی توسط استخراج با آب گرم 70°C استحصال شد و خالص سازی پلی ساکارید خام به ترتیب با استفاده از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفاکریل S-۴۰۰ به ترتیب $0/47\%$ و $0/25\%$ و مقدار قند کل خالص تعیین شده توسط روش فنل-اسید سولفوریک $98/9\%$ بود. نتایج حاصل از آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید خالص نشان داد که این ترکیب از واحدهای مونوساکاریدی زایلوز (Xyl)، گلوکز (Glc)، گالاکتوز (Gal) و اسید گلوکورونیک (GlcA) به ترتیب با نسبت های مولی $2/1$ ، $2/9$ ، $1/0$ و $1/2$ تشکیل شده است. ساختار پلی ساکارید خالص با استفاده از ترکیبی از روش های شیمیایی و دستگاهی مانند متیله کردن، اکسیداسیون پریدوات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، تعیین درجه چرخش نوری، کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی، طیف سنج مادون قرمز و طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای تک بعدی و دو بعدی و بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی گلوکز و زایلوز می باشد که با اتصالات (۱→۴) در زنجیر قرار دارند بعلاوه زنجیر اصلی در کربن شماره ۶ گلوکز منشعب شده است که شامل گالاکتوز با اتصالات (۱→۶) و اسید گلوکورونیک با اتصالات (۱→) در انتهای زنجیر جانبی است.

کلمات کلیدی: مریم گلی ارغوانی، پلی ساکاریدها، استخراج، خالص سازی، تعیین ساختار

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات

کلیات تحقیق	۲
۱-۱- کربوهیدرات ها.....	۲
۲-۱- مونوساکاریدها.....	۳
۱-۲-۱- روش های مختلف نمایش ساختمان مونوساکاریدها.....	۴
۱-۱-۲-۱- ساختار خطی فیشر.....	۴
۲-۱-۲-۱- ساختار حلقوی هاورث.....	۵
۱-۲-۳-۱- ساختار ملیس.....	۷
۲-۱-۲-۱- ساختار همتاشی مونوساکاریدها.....	۸
۲-۲-۱- ایزومری در قندها.....	۱۱
۳-۲-۱- قندهای اسیدی.....	۱۲
۳-۱- پلی ساکاریدها.....	۱۳
۱-۳-۱- ساختار پلی ساکاریدها.....	۱۳
۲-۳-۱- طبقه بندی پلی ساکاریدها.....	۱۴

- ۲۰.....۳-۳-۱- عوامل موثر بر حلالیت پلی ساکاریدها.....
- ۲۱.....۴-۳-۱- استخراج پلی ساکاریدها.....
- ۲۳.....۵-۳-۱- خالص کردن پلی ساکاریدها.....
- ۲۴.....۱-۵-۳-۱- خالص کردن پلی ساکاریدها با روش های آنزیمی.....
- ۲۴.....۲-۵-۳-۱- خالص کردن پلی ساکاریدها به روش کروماتوگرافی.....
- ۲۵.....۱-۲-۵-۳-۱- کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک.....
- ۲۵.....۲-۲-۵-۳-۱- کروماتوگرافی گاز - مایع (GLC).....
- ۲۷.....۳-۲-۵-۳-۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).....
- ۲۸.....۴-۲-۵-۳-۱- کروماتوگرافی ستونی.....
- ۲۹.....۵-۲-۵-۳-۱- کروماتوگرافی تبادل یونی.....
- ۳۱.....۶-۳-۱- معیار های خلوص پلی ساکاریدها.....
- ۳۲.....۷-۳-۱- ترسیب پلی ساکاریدها.....
- ۳۲.....۸-۳-۱- شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های شیمیایی.....
- ۳۲.....۱-۸-۳-۱- تعیین وزن مولکولی.....
- ۳۴.....۲-۸-۳-۱- تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکاریدها.....
- ۳۵.....۳-۸-۳-۱- تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی.....

- ۳۵.....متیلاسیون ۱-۳-۸-۳-۱
- ۳۸.....هیدرولیز اسیدی جزئی یا ملایم ۲-۳-۸-۳-۱
- ۳۹.....اکسیداسیون ۳-۳-۸-۳-۱
- ۳۹.....اکسایش پرپودات و تجزیه اسمیت ۴-۳-۸-۳-۱
- ۳۹.....اکسایش با تری اکسید کرومیوم ۵-۳-۸-۳-۱
- ۴۰.....شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های طیف سنجی ۹-۳-۱
- ۴۰..... NMR طیف سنجی ۱-۹-۳-۱
- ۴۱.....طیف سنجی جذب مولکولی ماوراء بنفش و مرئی ۲-۹-۳-۱
- ۴۲.....اجزاء تشکیل دهنده طیف سنجی ماوراء بنفش و مرئی ۱-۲-۹-۳-۱
- ۴۲.....کاربرد طیف سنجی ماوراء بنفش و مرئی ۲-۲-۹-۳-۱
- ۴۳.....طیف سنجی مادون قرمز ۳-۹-۳-۱
- ۴۵.....تاریخچه مریم گلی ۴-۱
- ۴۶.....معرفی گیاه مریم گلی ۱-۴-۱
- ۴۶.....گیاه مریم گلی معمولی ۲-۴-۱
- ۴۷.....گیاه مریم گلی ارغوانی ۳-۴-۱
- ۴۸.....ترکیبات شیمیایی گیاه مریم گلی ارغوانی ۵-۱

۴۹-۶-۱- خواص درمانی و کاربردی مریم گلی ارغوانی.....

فصل دوم: بررسی منابع

۵۲-۲- بررسی منابع.....

۵۲-۱-۲- استخراج، خالص سازی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها.....

۶۴-۳-۲- استخراج و شناسایی پلی ساکاریدهای محلول در آب گونه های مختلف مریم گلی.....

فصل سوم: مواد و روشها

۶۸-۳- مواد و روش ها.....

۶۸-۱-۳- مواد اولیه و محلول های شیمیایی

۶۸-۱-۱-۳- جمع آوری ریشه های مریم گلی ارغوانی

۶۸-۲-۱-۳- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده

۶۹-۲-۳- دستگاه های مورد استفاده.....

۷۰-۳-۳- روش کار.....

۷۰-۱-۳-۳- حذف رنگ، چربی، ساپونین و ریز مولکول ها

۷۱-۲-۳-۳- استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب

۷۱-۱-۲-۳-۳- استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از نمونه.....

۷۱-۲-۲-۳-۳- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب.....

- ۷۱..... ۳-۳-۲-۱- ترسیب پروتئین ها.
- ۷۲..... ۳-۳-۲-۲- ترسیب پلی ساکاریدهای محلول در آب.
- ۷۲..... ۳-۳-۳- خالص سازی پلی ساکاریدهای محلول در آب.
- ۷۳..... ۳-۴-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکارید خالص.
- ۷۴..... ۳-۴-۱- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص.
- ۷۴..... ۳-۴-۲- طیف سنج مادون قرمز
- ۷۵..... ۳-۴-۳- تعیین درجه چرخش نوری.....
- ۷۵..... ۳-۴-۴- جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش.....
- ۷۶..... ۳-۴-۵- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید.....
- ۷۸..... ۳-۴-۶- هیدرولیز اسیدی ملایم.....
- ۷۸..... ۳-۴-۷- اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت.....
- ۷۹..... ۳-۴-۸- متیلاسیون.....
- ۸۰..... ۳-۴-۹- طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای.....

فصل چهارم: بحث و نتایج

- ۸۲..... ۴-۱- استخراج، خالص سازی و شناسایی واحدهای سازنده پلی ساکارید.....
- ۸۲..... ۴-۱-۱- استخراج و خالص سازی.....

- ۴-۱-۲- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص..... ۸۳
- ۴-۲- تعیین ساختار..... ۸۵
- ۴-۲-۱- تعیین درجه چرخش نوری..... ۸۵
- ۴-۲-۲- تعیین قند کل و شناسایی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید خالص..... ۸۵
- ۴-۲-۳- طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص..... ۸۸
- ۴-۲-۴- هیدرولیز ناقص اسیدی..... ۸۹
- ۴-۲-۵- اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت..... ۹۰
- ۴-۲-۶- متیله کردن..... ۹۲
- ۴-۳- NMR پلی ساکارید خالص..... ۹۳

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: ساختار د - گلوکز (سمت چپ)، د - فروکتوز (وسط)، د - آرابینوز (سمت راست)..... ۴
- شکل ۱-۲: L- گلیسر آلدهید (سمت راست) و D- گلیسر آلدهید (سمت چپ)..... ۵
- شکل ۱-۳: بتا- د- گلوکز (سمت راست)، آلفا- د- گلوکز (وسط)، د- گلوکز (سمت چپ)..... ۶
- شکل ۱-۴: بتا- د- گلوکوپیرانوز (سمت راست) و آلفا- د- گلوکوپیرانوز (سمت چپ)..... ۶
- شکل ۱-۵: بتا- د- گلوکوفورانوز (سمت راست) و آلفا- د- گلوکوفورانوز (سمت چپ)..... ۷
- شکل ۱-۶: نمایش ساختار بتا- د- گلوکوپیرانوز: طرح های هم‌تاشی (راست)، هاورث (وسط)، ملیس (سمت چپ)..... ۸
- شکل ۱-۷: شکل صندلی حلقه پیرانوز..... ۹
- شکل ۱-۸: شکل قایق حلقه پیرانوز..... ۱۰
- شکل ۱-۹: شکل نیمه صندلی حلقه پیرانوز..... ۱۰
- شکل ۱-۱۰: شکل مورب حلقه پیرانوز..... ۱۰
- شکل ۱-۱۱: شکل پاکت (سمت چپ) و تاب دار حلقه فورانوز (سمت راست)..... ۱۱
- شکل ۱-۱۲: ساختار کلی پلی ساکاریدها..... ۱۴
- شکل ۱-۱۳: ساختار آلزینات..... ۱۶

- شکل ۱۴-۱: شکل (a) کیتین و (b) کیتوزان.....۱۶
- شکل ۱۵-۱: تشکیل زاویه چرخشی ω بزرگ حول پیوند گلیکوزیدی.....۱۸
- شکل ۱۶-۱: ساختار روبان مانند.....۱۹
- شکل ۱۷-۱: ساختار ماریپچ توخالی.....۲۰
- شکل ۱۸-۱: شمای اجزای دستگاه GC.....۲۷
- شکل ۱۹-۱: جداسازی قندهای آرابینوز، رامنوز، گلوکز، گالاکتوز، مانوز و زایلوز به روش کروماتوگرافی تبادل یونی و آشکارساز FAD.....۳۱
- شکل ۲۰-۱: توزیع وزن مولکولی و میانگین وزن مولکولی برای یک سیستم با وزن مولکولی ناهمگن.....۳۴
- شکل ۲۱-۱: واکنش متیلاسیون آلدوپیرانوز و آلدوفورانوز و تبدیل شدن به آلدیول های مربوطه.....۳۶
- شکل ۲۲-۱: نمایی از گیاه مریم گلی معمولی.....۴۷
- شکل ۲۳-۱: نمایی از گیاه مریم گلی ارغوانی.....۴۸
- شکل ۱-۲: شکل ساختاری کتیرا.....۶۲
- شکل ۱-۳: نمایی از ریشه های مریم گلی ارغوانی.....۶۸
- شکل ۱-۴: پلی ساکارید خالص ریشه مریم گلی ارغوانی.....۸۲
- شکل ۲-۴: منحنی فراکشن های شسته شده با ستون سفاکريل S-۴۰۰ (A) و

کروماتوگرام (B)HPGPC.....۸۴

شکل ۳-۴: طیف کروماتوگرام گازی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید (A) و پلی ساکارید خالص

احیا شده (B).....۸۶

شکل ۴-۴: طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص.....۸۸

شکل ۵-۴: طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص.....۹۴

شکل ۶-۴: طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص.....۹۴

شکل ۷-۴: طیف $H^1 - H^1$ COSY پلی ساکارید خالص.....۹۵

شکل ۸-۴: شکل ۸-۴: طیف $H^1 - C^{13}$ HMQC پلی ساکارید خالص.....۹۶

شکل ۹-۴: طیف HMBC پلی ساکارید خالص.....۹۸

شکل ۱۰-۴: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص ریشه مریم گلی ارغوانی.....۱۰۰

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: طبقه بندی پلی ساکاریدها بر اساس منشاء تولیدی.....۱۷
- جدول ۲-۱: انواع رزین های تبادل یونی و ترکیبات جداسازی شده.....۳۰
- جدول ۱-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص.....۹۰
- جدول ۲-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص.....۹۱
- جدول ۳-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص متیله شده.....۹۲
- جدول ۴-۴: مقادیر جابجایی شیمیایی پروتون و کربن پلی ساکارید خالص.....۹۷

فصل اول

کلیات

۱ کلیات تحقیق

۱-۱ کربوهیدرات ها

به گروهی از مواد آلی که به طور فراوان در طبیعت یافت می شوند و شامل انواع قندها، نشاسته، سلولز، دکستروزین ها و صمغ ها می باشند کربوهیدرات ها یا گلووسیدها^۱ می گویند. این مواد بیشتر در گیاهان وجود دارند و نقش آن ها به عنوان ذخیره کننده مواد غذایی و استحکام دهنده بافت و محافظت کننده گیاه می باشد. فرمول کلی کربوهیدرات ها $C_n(H_2O)_n$ و نسبت مولکولی هیدروژن و اکسیژن در آن ها ۲ به ۱ می باشد که کاملاً شبیه نسبت مولکولی این دو عنصر در آب است ولی این قانون در تمام موارد صادق نیست مانند رامنوز که فرمول مولکولی آن $C_6 H_{12} O_5$ می باشد (دانیال زاده و همکاران، ۱۳۷۴).

به علت فراوانی و همچنین ارزانی، کربوهیدرات ها تأمین کننده انرژی اکثر موجودات زنده اعم از دام و طیور و در نهایت انسان هستند. بجز نشاسته و گلیکوژن^۲ سایر پلی ساکاریدها مانند سلولز^۳، پکتین^۴، همی سلولز تقریباً بدون تغییر از دستگاه گوارش انسان خارج می شوند. این گروه که عمدتاً در دیواره سلول های گیاهی قرار دارند به عنوان فیبرهای غذایی شناخته می شوند و نقش مهمی را در تغذیه و سلامت انسان دارا هستند. فیبرهای غذایی باعث ایجاد حجم مواد غذایی مصرفی می شوند که در نتیجه به تخلیه مواد از روده کمک موثری می کند. این ویژگی به خروج مواد تجزیه شده یا تجزیه نشده و غیر قابل جذب که سبب بیماری و نارسایی در دستگاه گوارش می شوند کمک می کند. همچنین فیبرهای غذایی با اتصال به اسیدهای صفراوی و کاهش عمل جذب مجدد آنها سبب کاهش کلسترول خون می شوند (فاطمی، ۱۳۸۰).

¹ Glucides
² Glycogen
³ Cellulose
⁴ Pectin

ورولستد^۱ در سال ۱۹۹۳ تعریف دیگری از کربوهیدرات‌ها ارائه داد که طبق این تعریف قندها در واقع پلی‌هیدروکسی کربونیل‌هایی هستند که به شکل تک واحدی مانند مونوساکاریدها و یا چند واحدی مانند دی‌ساکاریدها (متشکل از دو واحد قندی) و تری‌ساکاریدها و الیگو‌ساکاریدها (متشکل از ۳ تا ۱۰ واحد قندی) و پلی‌ساکاریدها (بیش از ۱۰ واحد قندی) وجود دارند (جیلی جوان و همکاران، ۱۳۹۳).

۱-۲ مونوساکاریدها

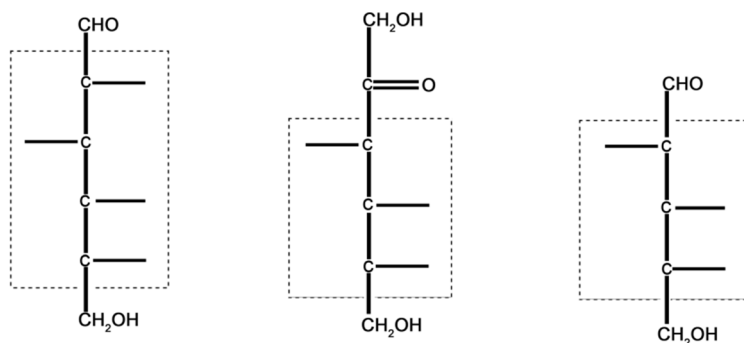
مونوساکاریدها به کربوهیدرات‌هایی اطلاق می‌شود که از یک واحدی قندی تشکیل شده‌اند و در اثر آبکافت به قند‌های ساده‌تر تبدیل نمی‌شوند (دانیال زاده و همکاران، ۱۳۷۴).

مونوساکاریدها می‌توانند از دو منبع اصلی به وجود آیند یکی از این منابع گلیسرآلدهید و دیگری دی‌هیدروکسی استون می‌باشد. به همین دلیل برای نام‌گذاری آن‌ها از پیشوند آلدو یا کتو و همچنین تعداد کربن موجود در ساختار مونوساکارید استفاده می‌شود مثل آلدوهگروز و کتوهگروز. بنابراین می‌توان تمام مونوساکاریدها را به دو گروه آلدوزها و کتوزها تقسیم بندی کرد. گلوکز فراوان‌ترین مونوساکارید است. گلوکز قندی شش کربنه است که یک عامل آلدیدی دارد و در واقع یک آلدوهگروز است. فروکتوز دارای یک عامل کتونی است و در واقع یک کتوهگروز می‌باشد (فاطمی، ۱۳۸۰).

آلدوزها یک گروه عاملی آلدیدی بر روی کربن شماره یک (C-1) دارند در حالیکه کتوزها دارای گروه کربونیلی بر روی کربن شماره دو (C-2) هستند. کربن شماره یک در آلدوزها و کربن شماره دو در کتوزها مراکز فعال این مولکول‌ها هستند و به عنوان کربن‌های آنومری نیز شناخته می‌شوند. قندهای آلدوز و کتوز خاصیت احیا کنندگی دارند و به عنوان قندهای احیا کننده شناخته می‌شوند

¹ Wrolstad

(جیلی جوان و همکاران، ۱۳۹۳). شکل شماره ۱-۱ ساختار د-گلوکز، د- فروکتوز و د- آرابینوز را نشان می دهد.



شکل ۱-۱: ساختار د-گلوکز(سمت چپ)، د- فروکتوز(وسط)، د- آرابینوز(سمت راست) (Wrolstad, 1993).

۱-۲-۱ روش های مختلف نمایش ساختمان مونوساکاریدها

۱-۱-۲-۱ ساختار خطی فیشر^۱

سیستمی که عموماً برای ساختار مونوساکاریدهای غیر حلقوی یا خطی مورد استفاده قرار می گیرد فرمول تصویری فیشر نامیده می شود که به اسم دانشمند مشهور هرمان امیل فیشر^۲ نام گرفته است که یک راه بدون ابهام را برای ترسیم ساختار مولکول های قند به تصویر می کشد.

فرمول تصویری فیشر از قوانین زیر تبعیت می کند:

✓ زنجیره کربنی به صورت عمودی کشیده می شود با یک گروه کربونیل در بالا و آخرین کربن در انتهای زنجیره.

✓ تمام خطوط عمودی نشان دهنده پیوندهای کربن - کربن در زیر صفحه تصویر هستند و خطوط افقی نشان دهنده پیوندها در بالای صفحه تصویر هستند.

✓ نام گذاری اتم های کربن در مونوساکاریدها همیشه از گروه کربونیل یا از نزدیک ترین

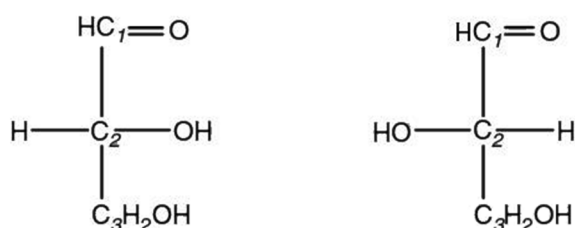
¹ Fischer

² Hermann Emil Fischer

انتهای زنجیره به گروه کربونیل شروع می شود.

ساده ترین مونوساکارید گلیسر آلدهید سه کربنه است. گلیسرآلدهید دارای یک کربن ایزومتريک (مرکز کایرال) است و دو شکل انانتیومری دارد. بر اساس روش نام گذاری مرسوم، این دو شکل L و D گلیسرآلدهید هستند (شکل ۱-۲). کربن کایرال کربنی است که چهار گروه مختلف به آن متصل شده است و می تواند به دو شکل فضایی متفاوت وجود داشته باشد. هر دو شکل فضایی، تصاویر آینه ای غیر قابل انطباق بر یکدیگر هستند. این دو ترکیب فرمول تجربی یکسانی دارند ولی دارای خصوصیات مختلف فیزیکی و شیمیایی هستند (El Khadem, 1988).

گروه OH متصل به اتم کربن کایرالی که بالاترین شماره را دارد در سری D در سمت راست تصویر فیشر قرار دارد در حالی که در سری L گروه OH ذکر شده در سمت چپ زنجیره واقع شده است. این موضوع می تواند به ساده ترین قندها یعنی D و L گلیسر آلدهید نسبت داده شود (شکل ۱-۲).



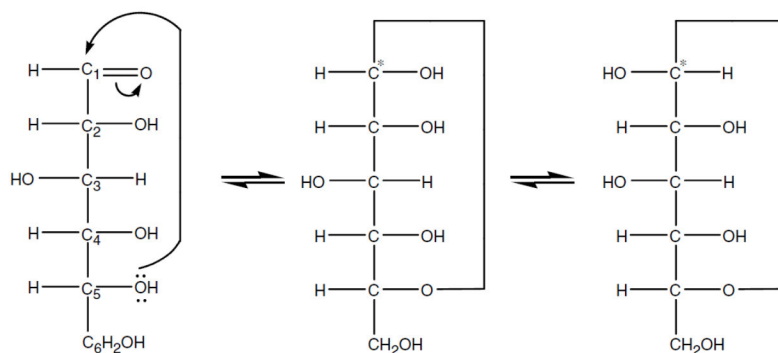
شکل ۱-۲: L- گلیسر آلدهید (سمت راست) و D- گلیسرآلدهید (سمت چپ) (Cui, 2005).

۲-۱-۲-۱ ساختار حلقوی هاورث (تشکیل حلقه در قندها)

پیش از این که فرم خطی در قندها تثبیت شود، شواهد نشان داد که فرم خطی فیشر تنها ساختار موجود در ترکیبات اصلی مخلوط های تعادلی نیست مثلا مشخص شد که مقدار اولیه چرخش ویژه D-گلوکز در محلول زیاد تغییر می کند و از ۱۱۲ + به ۵۲ + می رسد. در نهایت دو شکل از آلفا و بتا D-گلوکز تعیین و جداسازی شد که مقدار چرخش ویژه در آن ها متفاوت بود ولی دارای نقطه ذوب

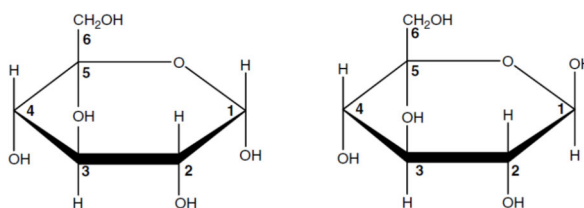
یکسانی بودند.

فرم های جدید D-گلوکز، در نتیجه جذب نوکلئوفیلیک درون مولکولی توسط اکسیژن گروه هیدروکسیل متصل به کربن شماره ۵ و گروه کربونیل می باشد که در نهایت تشکیل یک همی می دهند. بدلیل حلقوی شدن اتم کربن شماره ۱ آلدهیدی غیر کایرال به یک اتم کربن همی استال کایرال، دو فرم ایزومری جدید به نام آنومر تولید می شود که به دو صورت آلفا و بتا (شکل ۱-۳) نمایش داده می شوند (Cui, 2005).



شکل ۱-۳: بتا- D-گلوکز (سمت راست)، آلفا- D-گلوکز (وسط)، D-گلوکز (سمت چپ) (Cui, 2005).

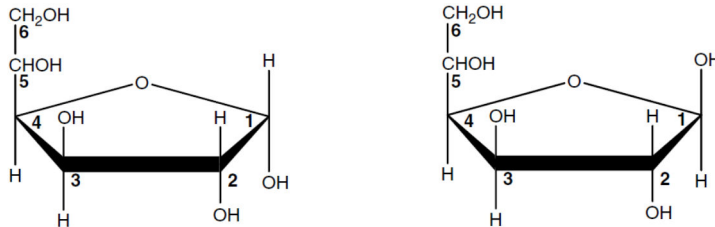
شخصی به نام هاورث^۲ (۱۸۸۳-۱۹۵۰) مدل حلقه ای ۶ ضلعی تتراهیدرو پیرانی را که پیرانوز^۳ نامیده می شود پیشنهاد کرد که در آن هر دو فرم آنومری به آسانی توسط مدل پرسپکتیوی هاورث ترسیم می شوند. در شکل شماره ۱-۴ مدل پرسپکتیوی هاورث آلفا و بتا گلوکوپیرانوز نشان داده شده است.



شکل ۱-۴: بتا- D-گلوکوپیرانوز (سمت راست) و آلفا- D-گلوکوپیرانوز (سمت چپ) (Cui, 2005).

¹ Hemiacetal
² Haworth
³ Pyranose

شکل ۱-۵ نشان می دهد که یک حلقه پنج ضلعی می تواند از واکنش درون مولکولی بین گروه کربونیل و اتم اکسیژن هیدروکسیل کربن شماره ۴ به وجود بیاید و تشکیل یک همی کتال^۱ بدهد. حلقه پنج عضوی تترا هیدرو فورانی، فورانوز^۲ نام دارد.



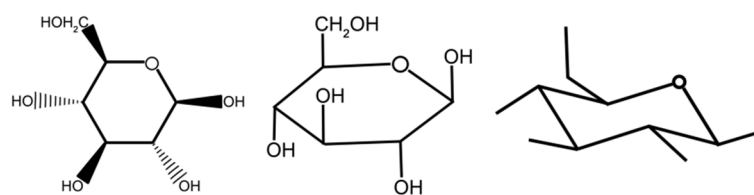
شکل ۱-۵: بتا-د-گلوکوفورانوز (سمت راست) و آلفا-د-گلوکوفورانوز (سمت چپ) (Cui, 2005).

مدل هاورث نسبت به فیشر ساختمان قندها را به شکل بهتری از نظر فضایی نمایش می دهد. در این طرح فرض بر این است که قسمت پر رنگ در جلو یا نزدیک بیننده قرار دارد. اما هنوز این طرح گمراه کننده است زیرا ساختمان حلقوی را در یک صفحه یا سطح نشان می دهد که واقعیت ندارد. به همین دلیل مدل های جدیدتری برای ترکیبات حلقوی قندها پیشنهاد شده است (فاطمی، ۱۳۸۰).

۱-۲-۳ ساختار ملیس^۳

ساختار ملیس در مورد گروه های هیدروکسیل موجود در حلقه که به هر دو صورت رو به بالا و رو به پایین قرار دارند، یک دید فضایی ایجاد می کند. ساختار همتاشی^۴، ملیس و هاورث در شکل شماره ۱-۶ نشان داده شده است (جبلی جوان و همکاران، ۱۳۹۳).

¹ Hemiketal
² Furanose
³ Melis
⁴ Conformational



شکل ۱-۶: نمایش ساختار بتا-دیگلوکوپیرانوز: طرح های همتاشی (راست)، هاورث (وسط)، ملیس (سمت چپ) (جبلی جوان و همکاران، ۱۳۹۳).

۱-۲-۱-۴ ساختار همتاشی مونوساکاریدها

پس از ابداع ساختارهای فیشر و هاورث، تلاش برای ارائه فرمول های جدید برای نمایش بهتر ساختمان قندها بیشتر شد تا این که ساختارهای همتاشی مدرن که مولکول قند را دقیق تر نمایش می دهد پیشنهاد شد (DeMan, 1999). طرح همتاشی نمایش سه بعدی است که اکسیژن درون حلقه نسبت به سایر اتم های ساختار دور افتاده است و گروه های استخلافی اصلی در گوشه و گروه های استخلافی محوری به شکل عمودی رسم شده اند. در مورد حلقه های پیرانوزی دو حالت پایدار صندلی و شش حالت پایدار قایق وجود دارد (جبلی و همکاران، ۱۳۹۳).

دو شکل معروف به صندلی که توسط هاورث پیشنهاد شد به صورت اکسیژن داخل مولکولی و اکسیژن خارج مولکولی است که شکل دقیق تر و صحیح تری برای حلقه های قندی است. در شکل اکسیژن خارج مولکولی که به صورت آنومر بتا است. تمام گروه های هیدروکسیل در موقعیت استوایی^۱ قرار دارند که نشان دهنده بیشترین پایداری ترمودینامیکی است. در فرم حلقوی آنومر آلفا گروه های هیدروکسیل در خلاف جهت اکسیژن قرار دارند. اشکال آنومریک قندها در محلول در حالت تعادل تاتومریک هستند که در چرخش نور پلاریزه توسط آن ها، موثر است. برای مثال مقدار آلفا و بتا آنومر D-گلوکز در یک محلول آبی در حالت تعادل به ترتیب ۳۶٪ و ۶۴٪ است (کرامت، ۱۳۸۷).

^۱ Equatorial

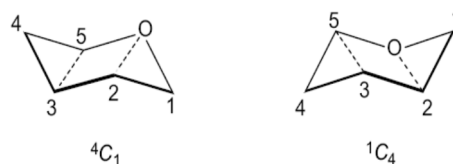
الف) شکل همتاشی حلقه پیرانوز

اشکال شناخته شده برای حلقه پیرانوز شامل اشکال صندلی شکل ۱-۷، قایق شکل ۱-۸، نیمه صندلی شکل ۱-۹، مورب شکل ۱-۱۰ و شکل مبلی است.

در زیر قوانین های مورد استفاده در طراحی اشکال مختلف ایزومری حلقه پیرانوزی آمده است.

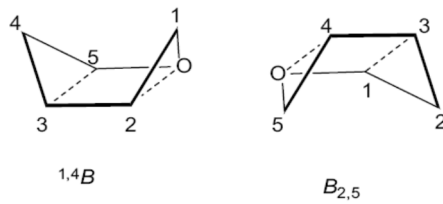
- ✓ برای مثال حروف لاتین C, B, H, S که حرف اول نام اشکال همتاشی است برای علامت اختصاری اشکال صندلی، قایق، نیمه صندلی و مورب به ترتیب استفاده می شود.
- ✓ از شماره اتم های موجود در حلقه به صورت پیشوند در بالای علامت اختصاری، برای نشان دادن اتم هایی که در صفحه همتاشی در بالای حلقه قرار می گیرند، استفاده می شود.
- ✓ از شماره اتم های موجود در حلقه به صورت پسوند در پایین علامت اختصاری، برای نشان دادن اتم هایی که در پایین صفحه همتاشی حلقه قرار می گیرند، استفاده می شود (Cui, 2005).

۱-۲-۱-۴-۱ شکل صندلی: صفحه اصلی شکل هندسی فرم صندلی توسط اتم های ۲-۳ و C-3 و O و C-5 مشخص شده است. دو ساختار برای حالت صندلی امکان پذیر می باشد (شکل ۱-۷).



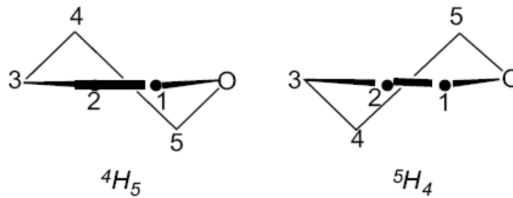
شکل ۱-۷: شکل صندلی حلقه پیرانوز (Cui, 2005).

۱-۲-۱-۴-۲ شکل قایق: شش ساختار برای حالت قایق امکان پذیر است که در شکل ۱-۸ دو ساختار نشان داده شده است.



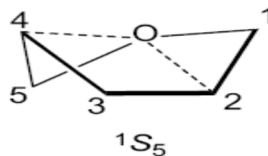
شکل ۸-۱: شکل قایق حلقه پیرانوز (Cui, 2005).

۱-۲-۱-۳-۴ شکل نیمه صندلی: دوازده شکل مختلف برای آن امکان پذیر است که دوتای آن در شکل ۹-۱ نشان داده شده است. صفحه اصلی شکل هندسی این فرم توسط چهار اتم متصل بهم مشخص شده است.



شکل ۹-۱: شکل نیمه صندلی حلقه پیرانوز (Cui, 2005).

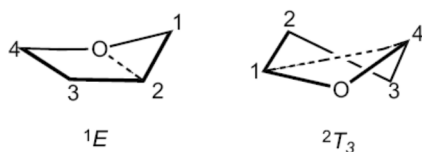
۱-۲-۱-۴-۴ شکل مورب: شش حالت برای آن امکان پذیر است که در شکل ۱۰-۱ یک نمونه از آن به نمایش در آمده است.



شکل ۱۰-۱: شکل مورب حلقه پیرانوز (Cui, 2005).

ب) شکل همتاشی حلقه فورانوز

۱-۲-۱-۴-۵ همتاشی اصلی حلقه فورانوز اشکال پاکت و تاب دار است. که برای هر دوی آن ها ۱۰ حالت مختلف امکان پذیر است (شکل ۱۱-۱).



شکل ۱-۱۱: شکل پاکت (سمت چپ) و تاب دار حلقه فورانوز (سمت راست) (Cui, 2005).

۱-۲-۲ ایزومری در قندها

تعداد زیادی از مواد عالی وجود دارند که عناصر تشکیل دهنده آن ها کاملاً شبیه به یکدیگرند ولی خواص شیمیایی آن ها به کلی با یکدیگر متفاوت اند. این پدیده را همپاری (ایزومری) و مواد فوق را همپار یا ایزومر می نامند. این پدیده در قندها نیز مشاهده می شود.

۱- ایزومر ساختاری: قندهای که دارای ایزومر ساختاری هستند که دارای فرمول یکسان بوده ولی از نظر شیمیایی متفاوت باشند این ایزومری به سه دسته تقسیم می شود.

✓ ایزومری زنجیری: در این نوع ایزومری طرز قرار گرفتن کربن ها به صورت خطی یا منشعب است.

✓ ایزومری وضعی: در این نوع ایزومری طرز قرار گرفتن گروه های استخلافی متفاوت است.

✓ ایزومری عاملی: در این نوع طرز قرار گرفتن عوامل مختلف شیمیایی متفاوت است.

۲- ایزومری فضایی: در این نوع ایزومری وضع قرار گرفتن گروه ها در فضا متفاوت است. ایزومرهای فضایی ایزومرهای مولکولی هستند که از نظر ساختمانی تنها در یک یا چند کربن نامتقارن با یکدیگر تفاوت دارند. هشت ایزومر فضایی هگوزی وجود دارد (دانیال زاده و همکاران، ۱۳۶۲).

✓ اپیمر^۱: به آن دسته از ایزومرهای فضایی گفته می شود که تنها در یک اتم کربن نامتقارن با هم تفاوت دارند مانند (D-گالاکتوز که اپیمر ۴-D-گلوکز). اپیمر ریشه تاریخی دارد زیرا

^۱ Epimer

تعیین نقطه ذوب مشتقات دی نیترو فنیل هیدرازین روشی سنتی برای شناسایی قندها بوده است.

✓ ایزومری D و L: در این نوع ایزومری، مولکولها تصاویر آینه ای غیر قابل انطباق هستند. قندهای L به ندرت در طبیعت وجود دارند. یک جفت انانتیومر در واکنش های شیمیایی برابر بوده و ویژگی های طعمی مشابهی دارند اما به هر حال به شکل متفاوتی در سیستم های بیولوژیکی عمل می کنند. هر چند انسان قندهای L- را جذب می کند، اما قندهای L- متابولیزه نشده و بنابراین ارزش انرژی زایی ندارند (جبلی جوان و همکاران، ۱۳۹۳).

✓ ایزومر نوری: ایزومرهای نوری ایزومرهایی هستند که مولکولها آن ها دارای یک کربن نامتقارن است و محلول آن ها می تواند نور قطبیده را در جهات مختلف بچرخاند. کربن نامتقارن کربنی است که چهار اتم مختلف به آن متصل شده باشد.

۱-۲-۳ قندهای اسیدی

هنگامی که گروه عاملی آلدهیدی آلدوزها تحت شرایط اکسید کننده ملایم قرار گیرد اسیدهای آلدونیک^۱ تشکیل می شوند. برای مثال اسید گلوکونیک از اکسایش گلوکز به وجود می آید. مهمترین نقشی که قندهای اسیدی بر عهده دارند، نقش حفاظتی روی مواد غذایی حساس به اکسیژن، که به علت واکنش با اکسیژن فاسد می شوند، است. در صورتی که از یک اکسنده قوی مانند اسید نیتریک استفاده شود، علاوه بر گروه عاملی آلدهیدی، گروه CH_2OH نیز اکسید می شود و اسیدهای آلداریک^۲ تولید می گردد. برای مثال گلوکز در مقابل این اکسنده به اسید گلوکاریک^۳ تبدیل می شود. در شرایطی که گروه عاملی آلدهیدی حفظ شود و فقط گروه CH_2OH اکسید شود در این حالت اسیدهای اورونیک^۴ تشکیل می شوند. برای مثال تولید اسید گالاکتورونیک^۱ در اثر اکسید شدن

¹ Aldonic acid

² Aldaric acid

³ Glucaric acid

⁴ Uronic acid

گالاکتوز است که واحد اصلی سازنده پکتین می باشد (فاطمی، ۱۳۸۰).

اسید- D - گلوکونیک متعاقبا با واکنش های درون مولکولی به ترکیباتی مانند گلوکولاکتونون^۲ و گلوکولاکتون^۳ تبدیل می شود. گلوکولاکتون به عنوان یک افزودنی مجاز پذیرفته است و در حالت عادی خنثی است ولی هنگام حل شدن در آب، به شکل اسیدی در می آید (جیلی جوان و همکاران ۱۳۹۳).

۱-۳ پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدها، یا کربوهیدرات هایی با وزن مولکولی بالا، بر خلاف قندها، غیر متبلور، غیر محلول در آب و بی مزه هستند. یک پلی ساکارید از تعداد زیادی واحدهای مونوساکارید که ممکن است همانند یا متفاوت باشند تشکیل شده است. یک مولکول آب برای تشکیل هر مولکول پلی ساکارید با اتصال بین دو مولکول مونوساکارید از دست می رود. اکثر پلی ساکاریدها مهم در مواد غذایی دارای ۶ اتم کربن هستند. فرمول عمومی برای این ترکیبات $(C_6 H_{12} O_6)_n$ است. ولی مقدار n متغیر است و عموما بسیار بزرگ می باشد. عمل آبکافت منجر به تجزیه مولکولی پلی ساکاریدها می شود. پلی ساکاریدها مانند قندها، توسط گیاهان از دی اکسید کربن و آب ساخته می شوند (Fox et al., 1977).

۱-۳-۱ ساختار پلی ساکاریدها

گلیکان اصطلاح کلی است که به پلی ساکاریدها نسبت داده می شود زیرا این ترکیبات از تعداد زیادی مونوساکارید یا گلیکوز با پیوندهای O-گلیکوزیدی تشکیل شده اند (Yalpani, 1988). در واقع پلی ساکاریدها، پلیمرهای متراکمی هستند که از پیوند گلیکوزیدی بین یک بخش همی استال یا همی کتال با یک گروه هیدروکسیل قند دیگر به عنوان مولکول پذیرنده حاصل می شوند. اتصال واحدهای

¹ Galacturonic acid

² Gluconolactone

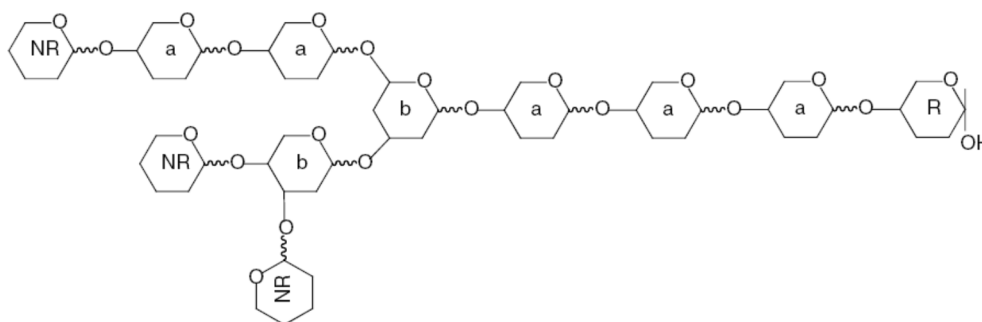
³ Gluconolactone

گلیکوزیل تک ظرفیتی با واحدهای آگلیکون چند ظرفیتی به عنوان مولکول پذیرنده نتایج زیر را در بردارد.

- ✓ امکان ایجاد انشعابات را در زنجیر پلی ساکاریدی فراهم می کند.
- ✓ ایجاد اتصالات متقاطع درون مولکولی بین زنجیرهای مجاور که بوسیله پیوندهای کوالانسی ایجاد می شود، از طریق پیوند گلیکوزیدی غیر ممکن می شود.

پلی ساکاریدها اکثرا خطی یا منشعب هستند به استثناء پلی ساکاریدهای حلقوی که سیکلو آمیلوز نامیده می شوند (Aspinall, 1972).

شکل ۱-۱۲ ساختار کلی پلی ساکاریدها را نشان می دهد. a زنجیره اصلی، b نقطه انشعاب، R انتهای احیاکننده و NR انتهای غیر احیا کننده می باشد.



شکل ۱-۱۲: ساختار کلی پلی ساکاریدها (Cui, 2005).

۱-۳-۲ طبقه بندی پلی ساکاریدها

الف) نوع واحد تشکیل دهنده

پلی ساکاریدها بر اساس مونوساکاریدهای مختلف سازنده خود به دو دسته هموپلی ساکاریدها^۱ و

^۱ Homopolysaccharide

هتروپولی ساکاریدها^۱ تقسیم بندی می شوند. در صورتی که پلی ساکارید از یک نوع واحد مونوساکاریدی تشکیل شده باشد به آن هموپلی ساکارید می گویند مانند سلولز، نشاسته، گلیکوژن (فاطمی، ۱۳۸۰). بعضی از هموپلی ساکاریدها به عنوان اشکال ذخیره ای مونوساکاریدها عمل می کنند و به عنوان تامین انرژی به کار می روند در حالیکه برخی دیگر به عنوان عناصر ساختمانی در دیواره سلولی گیاهان مانند سلولز و اسکلت خارجی بدن حیوانات و سخت پوستان مانند کیتین^۲ ایفای نقش می کنند (Lehninger et al., 1942). همو پلی ساکاریدها بر اساس نوع پیوندهای گلیکوزیدی بین واحدهای مونوساکاریدی مجزا می شوند. پیوندهای گلیکوزیدی می توانند به صورت اتصالات همو و هترو وجود داشته باشند (Cui, 2005).

زمانی که بیش از یک نوع واحد قندی در ساختمان پلی ساکارید وجود داشته باشد به آن هتروپولی ساکارید می گویند. نقش اصلی هتروپولی ساکاریدها، حفاظت خارج سلولی تمامی موجودات است. برای مثال قسمتی از لایه سخت پوشش سلول باکتری که پپتیدوگلیکان نام دارد از هتروپولی ساکاریدی تشکیل شده است که در ساختمان خود دارای دو واحد مونوساکاریدی تکراری است. در بافت های حیوانی، فضای خارج سلولی توسط انواع مختلفی از هتروپولی ساکاریدها اشغال می شوند. که با ایجاد یک ماتریکس، سلول ها را در کنار یکدیگر نگه داشته و سبب ایجاد شکل و همچنین حفاظت و پشتیبانی سلول، بافت ها و اعضاء می شوند. (Lehninger et al., 1942).


ب) بار یونی

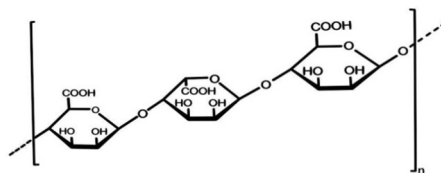
برخی از پلی ساکاریدها از واحدهای قندی ساده تشکیل شده اند که به آن ها پلی ساکاریدهای خنثی گفته می شود. پلی ساکاریدهایی مانند آمیلوز، آمیلوپکتین و سلولز از این دسته هستند. پلی ساکاریدهایی که در ساختارشان قندهای اسیدی دارند و حامل بارهای منفی هستند پلی ساکاریدهای

¹ Heteropolysaccharide

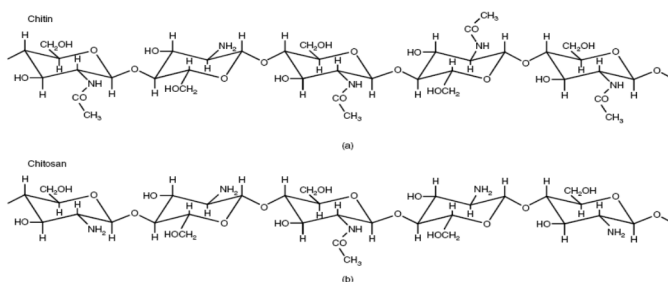
² Chitin

آنیونی نام دارند. برای مثال پکتین از واحدهای اسید گالاکتورونیک تشکیل شده یا آلژینات^۱ شکل (۱۳-۱) که دارای اسیدهای گلوکورونیک و مانورونیک است (فاطمی، ۱۳۸۰).

کیتوزان^۲ تنها پلی ساکارید کاتیونی شناخته شده است که در اثر اصلاح طبیعی پلی ساکارید حیوانی کیتین به حاصل می شود. کیتوزان پلیمری  شکل از بتا- ۴ - ۱ - آمینو - ۲ - دئوکسی - گلیکوپیرانوز است. که در pH ۶ تا ۷ بارالکتریکی مثبت دارد (شکل ۱-۱۴). کیتوزان همراه با آلژینات تشکیل پلی الکتریک می دهد که منجر به تشکیل غشاهای پلی آنیونیک شده و در حضور عوامل شلاته کننده و آنتی ژن پایدار است. معلق کردن کپسول آلژینات در محلول کیتوزان با وزن مولکولی پایین منجر به کاهش ۴۰٪ رهائش سلول ها می شود (شعبانی فر، ۱۳۹۲).



شکل ۱-۱۳: ساختار آلژینات (Cui, 2005).



شکل ۱-۱۴: شکل (a) کیتین و (b) کیتوزان (Cui, 2005).

¹ Alginate
² Chitosan

ج) منشاء

پلی ساکاریدها عموماً بر اساس منشا تولیدی به چهار گروه: حیوانی، گیاهی، دریایی و میکروبی تقسیم بندی می شوند (جدول ۱-۱).

جدول ۱-۱: طبقه بندی پلی ساکاریدها بر اساس منشاء تولیدی (Cui, 2005).

منشا	نام پلی ساکارید
حیوانی	گلیکوژن، کیتین، کیتوزان، گلیکوزآمینوگلیکان
گیاهی	پکتین، آرابینوگزیلان، آرابینوگالاکتان، اینولین، سلولز،
دریایی	آگار، کاراگینان، آلژینات
میکروبی	صمغ زانتان، ژلان، دکستران، کردلان، پولالان، ولان، زوگلان، لوان

د) نوع توالی مونومرها در زنجیر

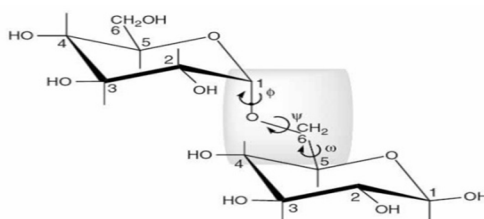
پلی ساکاریدها بر اساس توالی انواع واحدهای قندی در زنجیرهای کربوهیدرات به سه دسته تقسیم می شوند.

- ✓ انواع متناوب: در این گروه واحدهای قندی بر طبق الگوی تکرار شونده آرایش پیدا کرده اند.
- ✓ انواع منقطع: در این گروه زنجیرها با توالی متناوب توسط توالی های نامنظم از یکدیگر جدا شده اند.
- ✓ انواع بی قاعده: در این گروه توالی های نامنظم و بی قاعده از انواع واحدهای مونوساکاریدی، موقعیت و شکل فضایی پیوندها وجود دارد (Cui, 2005).

ذ) ساختار همتاشی پلی ساکاریدها

همانطور که قبلا توضیح داده شد، پیوند گلیکوزیدی زمانی تشکیل می شود که گروه هیدروکسیل یک قند با کربن آنومری قند دیگر واکنش می دهد. این واکنش همراه با تولید یک استال از یک همی استال و یک گروه هیدروکسیل از مولکول قند دوم است. پیوندهای گلیکوزیدی به سادگی توسط اسید هیدرولیز می شوند ولی در مقابل بازها مقاوم هستند. وقتی که یک کربن آنومری در پیوند گلیکوزیدی شرکت می کند، آن قند دیگر نمی تواند به شکل خطی تبدیل شود و بنابراین یک قند غیر احیاء کننده است. وقتی به دی ساکاریدها و پلی ساکاریدها اشاره می شود، انتهای زنجیر دارای کربن آنومری آزاد هستند که در پیوند گلیکوزیدی شرکت نکرده است و انتهای این قندها احیا کننده است (Lehninger et al., 1942).

هنگامی که پیوند گلیکوزیدی بین کربن شماره ۱ و کربن شماره ۶ مولکول دیگر تشکیل می شود زاویه پیچش بزرگ به وجود می آید که ω نام دارد. شکل این زاویه، آزادی چرخش بیشتری را برای دو مونوساکارید نسبت به یکدیگر فراهم می کند (شکل ۱-۱۵). پیوندهای همتاشی توسط مقادیری مشخص از زوایای ω و ψ تعریف می شوند. که این نوع ساختار، ساختار پایه یا ساختار اولیه پلی ساکاریدهاست (Cui, 2005).



شکل ۱-۱۵: تشکیل زاویه چرخشی ω بزرگ حول پیوند گلیکوزیدی (Cui, 2005).

معمولا اشکال همتاشی قندها تمایل رسیدن به سطح انرژی پایین تر دارند در نتیجه زنجیرهای پلی ساکاریدی متشکل از ساختار اولیه به شکل های ویژه هندسی خاصی مانند روبان و مارپیچ آرایش می یابد که ساختار دوم پلی ساکارید نامیده می شود. ساختار کلی پلی ساکاریدها به دو دسته منظم و

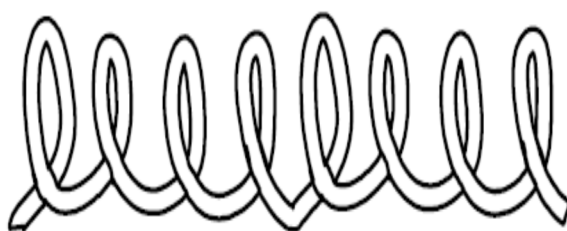
نامنظم تقسیم می شوند. در ساختار منظم مقادیر زاویه چرخشی در فعل و انفعالات ثابت است (مانند حالت ژل و جامد) ولی در حالت نامنظم مقادیر زاویه چرخشی حول پیوند گلیکوزیدی متغیر می باشد و دارای نوسانات موضعی است. ساختار مارپیچ تصادفی از خصوصیات پلی ساکاریدهای خطی محلول در آب می باشد که از نوع همتاشی نامنظم است (Ress.,1997).

ساختار همتاشی زنجیره‌های هم‌پولی ساکاریدی معمولاً به دو شکل روبان و مارپیچ توخالی است. زاویه دی هدرال (دوسطحی) ساختار همتاشی روبان مانند زنجیر پلی ساکاریدی نزدیک به ۱۸۰ درجه است (شکل ۱-۱۶). برای مثال پیوند بین بخش های بتا -D- گلوکوزیل با اتصالات ۱ به ۴ و آلفا -D- گالاکتوزیل با اتصالات ۱ به ۴ در یک زنجیر پلی ساکاریدی به صورت پل موازی بین دو اتم اکسیژن است که به شکل هندسی زیگزاگ می باشد. نمونه هایی از این نوع پیوندها در ساختار دیواره سلولی گیاهان، سلولز، زایلان و مانان دیده می شوند (Cui, 2005).



شکل ۱-۱۶: ساختار روبان مانند (Cui, 2005).

در ساختار هلیکس (مارپیچ) توخالی، اتصالات بین مونومرها به شکل کوتاه و U شکل است (شکل ۱-۱۷). مانند پیوند بین بتا -D- گلوکوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۳ و آلفا -D- گلوکوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۴. از آن جایی که نوع آرایش به صورت مارپیچ توخالی محوری بلند است، زنجیره های پلیمری معمولاً با پیچیدن به دور یکدیگر به صورت هلیکس دوتایی و سه تایی پایدار می شوند. این نوع ساختار در آمیلوز مشاهده می شود (Ress.,1997).



شکل ۱-۱۷: ساختار مارپیچ توخالی (Cui, 2005).

از شکل های دیگر ساختار همتاشی مارپیچ هم محور است که در پیوندهایی با اتصالات ۱ به ۳ دیده می شود برای مثال ساختار پلی ساکارید باکتری کردلان با پیوند بتا - د - گلوکوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۳ از این نوع است.

از لحاظ تئوری پلی ساکاریدهایی با اتصالات ۱ به ۲ زاویه دی هدرال حدود ۶۰ درجه دارند که ساختار آن ها روبان مانند منحنی با شکل انعطاف پذیر است و در توالی مونومرهای اسید گالاکتورونیک و پکتین و تعدادی از پلی ساکاریدهای باکتریایی وجود دارند. همچنین پلی ساکاریدهایی با اتصالات ۱ به ۶ به دلیل وجود پیوندهای کوالانسی دوتایی و سه تایی دارای انعطاف پذیری بیشتری هستند تمایل بیشتری به ساختارهای همتاشی فتری نسبت به ساختارهای بسته منظم دارند (Ress, 1977).

۱-۳-۳ عوامل موثر بر حلالیت پلی ساکاریدها

شناسایی و تشخیص ویژگی های پلی ساکاریدها در ابتدا نیازمند جداسازی و خالص سازی پلیمر قندی مورد نظر از منبع اصلی است. ماهیت پلی ساکاریدها و خصوصیات ترکیب شیمیایی و ساختار مولکولی و وزنی آن ها بر روی حلالیتشان موثر است. حضور انشعابات در زنجیر مولکولی باعث گسستگی اتصالات درون مولکولی و پیشروی حلال و حلالیت بیشتر می شود. برای مثال آمیلو پکتین با درجه انشعاب بالا حلالیت و ثبات حل پذیری بیشتری نسبت به مولکول آمیلوز خطی در محلول دارد.

حضور گروه های یونی بویژه گروه های کربوکسیل یا سولفات در زنجیرهای پلیمری باعث بهبود حلال پوشی و جلوگیری از تشکیل اتصالات درون مولکولی از طریق دافعه الکترواستاتیک می شود. پلی ساکاریدهای آنیونی به طور کلی حل پذیری بیشتری نسبت به پلی ساکاریدهای خنثی دارند. اتصالات گلیکوزیدی ۱ به ۴ ساختار متقارن تری را فراهم می کند و ارتباط داخل مولکولی را بین واحدهای زنجیر آسان تر می کند ولی اتصالات ۱ به ۳ تقارن کمتری ایجاد می کنند و حلالیت پلیمرهای کربوهیدرات را افزایش می دهند. برای مثال سلولز با اتصالات ۱ به ۴ گلیکوزیدی حلالیت کمتری در آب دارد در حالیکه بتا - گلوکان با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۴ دارای حلالیت بیشتری در آب است.

فرم آنومری آلفا در پیوندهای گلیکوزیدی حلالیت کاملی در زنجیر کربوهیدراتی ایجاد نمی کند ولی در مقایسه با فرم بتا حلالیت بهتری دارد. برای مثال سلولز با اتصالات گلیکوزیدی بتا ۱ به ۴ در پلیمری از گلوکز کاملاً نامحلول است ولی آمیلوز با اتصالات آلفا ۱ به ۴ حلالیت بیشتری دارد.

غیر یکنواختی در واحدهای تکرار شونده موجود در ساختار هتروپلی ساکاریدها که شامل یک یا دو نوع واحد مونوساکاریدی هستند در حلالیت تاثیر گذار است. هتروپلی ساکاریدهای نامبرده با توجه به شکل یا موقعیت پیوند دارای حلالیت بیشتری نسبت به هموپلی ساکاریدها هستند. پیوندهای کوالانسی و غیر کوالانسی پلیمرهای کربوهیدراتی با دیگر ترکیبات داخل بافت اثر ویژه ای بر حلالیت و استخراج آن ها در محیط های آبی دارد (Cui, 2005).

۱-۳-۴ استخراج پلی ساکاریدها

به طور کلی پلی ساکاریدهای ذخیره ای، صمغ های تراوشی و پلی ساکارید کپسول باکتری ها بسیار آسانتر از ماتریکس دیواره سلولی گیاهان استخراج می شوند. برای مثال صمغ زانتان تولید شده توسط

باکتری زانتوموناس کامپستریس^۱ بسیار آسان از محیط کشت جدا شده و توسط ترسیب با اتانول جداسازی می شود (BeMiler et al., 1996).

از سوی دیگر پلی ساکاریدهای مورد نظر باید از مواد نامحلول موجود در دیواره سلولی گیاهان جدا شوند. یکی از روش های جداسازی پلی ساکاریدها از بافت گیاهان، استفاده از آسیاب برای رسیدن به کیفیت و کمیت بهتر می باشد. همچنین فرایند حذف چربی از مواد مورد نظر لازم است زیرا حضور چربی می تواند نفوذ آب را محدود و بر روی راندمان استخراج اثر منفی بگذارد. لیپیدها معمولاً توسط حلال های غیر قطبی حذف می شوند مانند محلول متانول - کلروفرم (۵:۹۵ v/v) و اتانول ۹۰٪ یا دی اکسان و هگزان. رفلاکس در اتانول اغلب برای غیر فعال کردن آنزیم های هیدرولیتیک درون سلولی موجود در مواد بیولوژیکی انجام می گیرد (Cui, 2005).

پلی ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی گیاهان می توانند توسط حلال های مختلفی استخراج شوند اما استفاده از حلال آب با دماهای گوناگون اولین انتخاب برای استخراج پلی ساکاریدها است. راندمان استخراج پلی ساکاریدها معمولاً با افزایش دما در محلول های آبی افزایش می یابد (جبلی جوان و همکاران ۱۳۹۳).

پلی ساکاریدهای اسیدی مانند پکتین در کمپلکس های دو ظرفیتی یون های فلزی همراه با عوامل شلاته کننده مانند آمونیوم اگزالات، سدیم هگزا متا فسفات، EDTA محلول هستند.

حلال های غیر آبی قطبی مانند دی متیل سولفوکسید^۲ حلال شناخته شده و مناسبی برای گرانول های نشاسته است. همچنین N - متیل مورفولین - N - اکسید به عنوان یک حلال خوب برای پلی ساکاریدهای دیواره سلولی از جمله سلولز، معرفی شده است.

از محلول های اسیدی معمولاً برای استخراج پلی ساکاریدها اجتناب می شود زیرا این محلول ها باعث

¹ Xanthomonas campestris

² Dimethyl sulphoxide

هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی می شوند. محلول های قلیایی به طور گسترده برای استخراج پلی ساکاریدها استفاده می شوند. برای مثال معمولا بروهیدرات سدیم را به محلول های استخراج برای کاهش خطر حذف بتا در واکنش های حساس اضافه می کنند. هیدروکسید باریم اشباع یک ماده شناخته شده برای استخراج عصاره های آبی محلول آرابینو گزیلان از گندم و جو است در حالیکه محلول های رقیق هیدروکسید سدیم برای استخراج زایلوگلوکان، زایلان، بتا گلوکان و پکتین مورد استفاده قرار می گیرد. روش های مختلفی برای جداسازی پلی ساکاریدهای نامحلول مانند سلولز استفاده می شود. سلولز از کتان خام و چوب با حذف ترکیبات دیگر مانند موم ها و لیپیدها توسط کلروفرم، بنزن، اتانول و حذف لیگنین توسط اسید کلروز^۱ و حذف همی سلولزها توسط تیمار قلیایی استخراج می شود زیرا سلولز نسبت به سایر ترکیبات نامحلول تر است. هر چند سلولز می تواند در محلول های کلرید روی یا کادوکسن^۲ و همچنین محلول اکسید کادمیم ۵٪ حجمی وزنی و محلول ۲۵٪ حجمی - حجمی اتیلن دی آمین در آب حل شود (Cui, 2005).

۱-۳-۵ خالص کردن پلی ساکاریدها

روش های استخراج بیان شده در بالا، معمولا باعث حصول محلول هایی شامل مخلوطی از ترکیبات مختلف اعم از پلی ساکاریدها به همراه پروتئین و ترکیبات غیر کربوهیدراتی می شود. مواد غیر کربوهیدراتی مانند پروتئین ها بوسیله هضم توسط آنزیم های پروتئولیتیک مانند پاپائین یا پروتئازهای باکتریایی حذف می شوند. همچنین پروتئین ها با ترسیب توسط اسید تری کلرواستیک و اسید سولفوسالسیلیک حذف می شوند ولی خطر ترسیب صمغ ها مثل آلژینات یا پکتین با درجه متوکسیل پایین نیز وجود دارد (Cui, 2005). جذب غیر اختصاصی پروتئین های گیاهان با استفاده از سطح حاوی پوشش سیلیس یا انواع خاک های رس نیز انجام می شود.

¹ Chlorous acid

² Cadoxen

حذف پروتئین ها به روش سواگ متداولترین روش مورد استفاده جهت حذف پروتئین از محلول های قندی است. در این روش پروتئین ها در یک امولسیون حاوی کلروفورم واسرشت شده و پس از فرایند سانتریفیوژ کردن به صورت یک لایه ژل مانند در حد واسط کلروفورم - آب ظاهر می شوند. جهت تسریع واسرشتن پروتئین ها، می توان از یک بافر با pH ۴-۵ به جای آب استفاده کرد و بعد از آن ۱- بوتانول یا ۱- پنتانول اضافه می شود. این مرحله به دفعات برای حذف کامل پروتئین ها تکرار می شود اما افت مقدار پلی ساکارید را نیز به دنبال خواهد داشت (جهان بین، ۱۳۹۰).

۱-۳-۵-۱ خالص کردن پلی ساکاریدها با روش های آنزیمی

حذف ناخالصی های دیگر از پلیمرهای کربوهیدراتی را می توان توسط هضم آلاینده خاص توسط آنزیم هیدرولیتیک مناسب انجام داد. نکته مهم در این روش استفاده از آنزیم های خالص بدون فعالیت جنبی برای رسیدن به هدف مورد نظر است. برای مثال از آنزیم آلفا - آمیلاز بزاق و پانکراس خوک بدلیل خالص بودن و عدم فعالیت جنبی در این محصول، می توان برای حذف آلاینده های پلیمر نشاسته استفاده کرد (Cui, 2005).

۱-۳-۵-۲ خالص کردن پلی ساکاریدها به روش کروماتوگرافی

عصاره های گیاهی، حاوی مخلوطی از قندها هستند درحالیکه محققین معمولاً به شناسایی قندهای انفرادی و اندازه گیری غلظت آن علاقه دارند. روش های کروماتوگرافی دارای مزیت حذف مواد مزاحم و امکان حفظ نشانه ها هستند که به شناسایی این قندها کمک می کنند. روش های کروماتوگرافی، سریع، حساس و برای آزمایشات روتین مناسب هستند (جیلی جوان و همکاران ۱۳۹۳).

۱-۳-۵-۲-۱ کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک^۱

کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک، به طور گسترده در دهه ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ برای تجزیه قندها مورد استفاده قرار گرفت. هزینه تجهیزات این روش بسیار کم و حساسیت آن ۱ میکروگرم است (Stahl, 1969).

در این روش، اسپری آشکارکننده متعددی تولید شده اند که با برخی از آن ها می توان قندهای احیاء کننده را از قندهای غیر احیاءکننده، پنتوزها را از هگزوزها و آلدوزها را از کتوزها تشخیص داد (Southgate, 1991).

هر چند استفاده از این کروماتوگرافی در بسیاری از آزمایشگاه ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)^۲ جایگزین شده است، اما هنوز یک تکنیک پر کاربرد در این زمینه است. برای مثال، سوالو و لو^۳ (۱۹۹۳) با هدف مقایسه، از کروماتوگرافی کاغذی به همراه HPLC کروماتوگرافی گاز - مایع (GLC)^۴ و C NMR در تشخیص الیگوساکاریدهای جزئی در شربت اینورت تجاری چغندر استفاده کردند. در این بررسی، از واکنش گر اسید دی نیتروسالیسیک برای تشخیص احیاءکننده یا غیر احیاء کننده بودن الیگوساکارید جدا شده استفاده شد و واکنش گر آنترون برای تشخیص وجود کتوز در الیگوساکارید مورد استفاده قرار گرفت (جبلی جوان و همکاران ۱۳۹۳).

۱-۳-۵-۲-۲ کروماتوگرافی گاز - مایع (GLC)

کروماتوگرافی گازی از تکنیک های پیشرفته ای است که برای جداسازی و تشخیص کمی و کیفی مواد تشکیل دهنده ترکیبات مختلف به کار برده می شود. اساس عمل دستگاه کروماتوگرافی گازی به این صورت است که نمونه مورد آزمایش پس از تزریق وارد فاز متحرک شده و همراه آن وارد ستون

¹ Thin Layer Chromatography

² High performance Liquid Chromatography

³ Swallo and low

⁴ Gas-Liquid Chromatography

(فاز مثبت) می شود. سپس نمونه مورد نظر توسط حرارت تفکیک شده و بین گاز و فاز ثابت (جامد یا مایع) پخش شده که ممکن است حل یا جذب شود. با در نظر گرفتن زمان لازم برای خروج ترکیب مورد نظر از ستون (زمان بازداری) و حجم گاز مورد نیاز برای خارج شدن ترکیب مورد نظر از ستون ارزیابی کمی و کیفی بوسیله آشکارساز صورت می گیرد. کروماتوگرافی گازی به دو شکل زیر مورد استفاده قرار می گیرد.

الف) کروماتوگرافی گاز - مایع (GLC): در این نوع کروماتوگرافی فاز ثابت، مایع است و از ترکیبات سیلیس، پلیمرهای ویژه و غیره می باشد که در یک لوله مخصوص جای داده شده است. در این سیستم فاز متحرک را گازهای بی اثر مانند هلیوم، ازت، هیدروژن و آرگون تشکیل می دهند (Englyst et al., 1984).

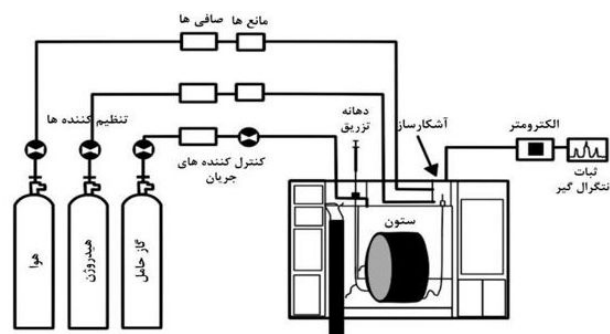
این روش تکنیکی است برای جداسازی ترکیبات در یک مخلوط براساس میزان تمایل واکنش اجزاء با فاز ثابت مایع. نمونه در یک فاز گازی حل شده و در طول ستون با منفذ بسیار کوچک حرکت می کند که فضای داخلی آن با فاز ثابت مایع پر شده است. این نوع جداسازی بر اساس فشار و دمای بالا انجام می شود (Sloneker, 1972).

ب) کروماتوگرافی گاز - جامد (GSG)¹: در این کروماتوگرافی، فاز ثابت جامد بوده و از ترکیبات جاذب و فعلی مثل آلومینا، سلیکاژل و کربن که در یک لوله مخصوص جای داده شده است تشکیل شده و فاز متحرک شامل گازهای بی اثر است. کروماتوگرافی گاز - جامد مبتنی است بر جذب سطحی مواد گازی بر روی سطوح جامد و برای گونه هایی مفید است که بوسیله ستون هایی گاز - مایع نگهداشته نمی شوند مانند اجزاء تشکیل دهنده هوا، سولفید هیدروژن، دی سولفید هیدروژن، دی اکسید کربن و گازهای دیگر (باقری، ۱۳۸۴).

یکی از پرکاربردترین روش ها برای آنالیز کربوهیدرات ها استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی است.

¹ Gas-solid chromatography

کروماتوگرافی گازی تکنیکی ثابت و بهینه سازی شده است، به مقدار کم نمونه در اندازه های کوچک نیاز دارد و بسیار حساس می باشد. شرط لازم برای جداسازی با این روش این است که نمونه فرار باشد برای همین مونوساکاریدهای خنثی قبل از آنالیز باید به استات های آلدیول مربوطه و مونوساکاریدهای اسیدی به تری متیل سیلیل^۱ (TMS) تبدیل شوند سپس در یک حلال مناسب حل شده و به ستون GC تزریق شوند. یکی از معایب این روش نسبت به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا این است که آماده سازی نمونه قبل از تزریق به دستگاه کاری دشوار می باشد (Cui, 2005). شکل ۱-۱۸ شمای کلی دستگاه GC را نشان می دهد.



شکل ۱-۱۸: شمای اجزای دستگاه GC (جهان بین، ۱۳۹۰).

۱-۳-۲-۵-۳ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

در بسیاری از آزمایشگاه ها، HPLC روشی متداول برای شناسایی قندهاست. این روش با زمان فرایند ۲۰ دقیقه یا کمتر، دارای مزیت کمی و سریع بودن است. برای بسیاری از کاربردها، آماده سازی کمی برای نمونه نیاز است. اساس عمل دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به این صورت است که ابتدا فاز متحرک توسط پمپ های مخصوص با فشار و حرارت مشخص همراه با نمونه مورد آنالیز وارد پیش ستون شده و در ادامه وارد ستون اصلی می شود. در این سیستم فاز ثابت داخل یک ستون فلزی استیل به قطر حدود ۵ میلی متر قرار می گیرد. در نهایت نمونه هایی که بوسیله ستون تفکیک شده اند توسط آشکارسازهای مختلف شناسایی و مورد ارزیابی قرار می گیرند (Cui, 2005).

¹ Trimethylsilyl

از آنجا که تشخیص با UV بدلیل تداخل احتمالی در محدوده زیر UV که قند در آن جذب دارد، غیر عملی است، آشکارسازهای ضریب شکست با حساسیت ۱ mg رواج بیشتری دارند. در بسیاری از نمونه های قندی، غلظت قند به گونه ای است که در دامنه حساسیت دستگاه قرار دارد. محدودیتی که برای آشکارسازهای ضریب شکست وجود دارد این است که در صورت استفاده از آن ها در HPLC، نمی توان از شستشوی گرادیانی استفاده کرد. از کروماتوگرافی فاز نرمال با ستون های دارای آمین باند شده، به طور گسترده در آنالیز قندها استفاده می شود. ترتیب شستشو به صورت مونوساکاریدها و الکل های قندی، سپس دی ساکاریدها و الیگوساکاریدهای بزرگتر است (Ellefson, 2005). مشکلی که در مورد ستون های دارای باند آمین وجود دارد این است که قندهای احیاء کننده با عوامل آمینی متراکم می شوند. این واکنش عمر ستون را کاهش داده و بخشی از قند قابل اندازه گیری نخواهد بود. مشکل دیگر، تفکیک ضعیف گلوکز، گالاکتوز و سوربیتول است. اندازه گیری صحیح گلوکز و سوربیتول برای آب میوه ها اهمیت ویژه ای دارد (Wrolstad, 1993).

۱-۳-۵-۲-۴ کروماتوگرافی ستونی^۱

کروماتوگرافی ستونی از متداولترین روش های جداسازی در آزمایشگاه هاست. ترکیبات مختلفی در آماده کردن ستون کروماتوگرافی مورد استفاده قرار می گیرند و تمامی آن ها باید، قبلاً از استفاده، با حلال های مناسب و پیشنهادی به حالت تعادل در آیند. بعلاوه، تعدادی از مواد کروماتوگرافی باید قبلاً آماده شوند. در فیلتراسیون ژلی، لازم است مواد مدتی خیسانده شوند و پس از جذب، مواد مورد نظر فعال شده که این عمل ممکن است توسط حرارت یا مجاورت با اسیدها امکان پذیر شود یا این که رزین های کروماتوگرافی تعویض یونی به صورت یونیزه مورد استفاده قرار گیرند (علمی آخونی، ۱۳۷۰).

¹ Column chromatography

کروماتوگرافی روی ستون رزین تبادل کاتیونی به شکل کلسیم و با محلول شوینده آب روشی مناسب برای جداسازی بسیاری از قندها و پلی آل ها و مشتقاتشان است. این روش شامل مزیت هایی است از جمله:

۱- جداسازی سریع و آسان و با کیفیت است. ۲- از آب به عنوان شوینده استفاده می شود. ۳- در موارد مطلوب ظرفیت ستون زیاد است. ۴- ستون برای مدت زمان طولانی پایدار است و نیازی به احیاء آن نیست. ۵- با یک بار شستن اجزای ترکیب قندی قابل جداسازی است. ۶- توالی خروجی ستون را می توان پیش بینی کرد. انتخاب نوع رزین کروماتوگرافی و همچنین اندازه ذرات رزین و میزان فشار ستون و مدت زمان فرایند در جداسازی قندهای خنثی حائز اهمیت است (Ohms et al., 1967).

۱-۳-۵-۲-۵ کروماتوگرافی تبادل یونی^۱

از ساده ترین روش های کروماتوگرافی، کروماتوگرافی تبادل یونی است که در آن از رزین هائی^۲ استفاده می شود که از ترکیبات حلقوی ساخته شده اند و برای جداسازی یون های معدنی و مولکول های کوچک مناسب است. این روش برای جداسازی مولکول های درشت مثل پروتئین ها به علت عدم توانایی آنها برای نفوذ و تماس با رزین، مناسب نیست. همچنین پروتئین ها در اثر مجاورت با ماتریکس هیدروفوبیک^۳ دناتوره می شوند. سلولز اولین نمونه ای است که به منظور جداسازی ماکرومولکول ها مورد استفاده قرار گرفت. از معایب سلولز این است که ظرفیت محدودی دارد و نمی تواند مواد بیشتری را جذب کند زیرا در اثر جذب بیش از حد به صورت محلول در می آید. به همین دلیل از ترکیبات دیگر مانند دکستران یا آکریل آمید^۴ که پلیمریزه شده و دارای ظرفیت زیادتری هستند استفاده می شود (علمی آخونی، ۱۳۷۰). رزین های تبادل یون شامل مواد ارگانیکی پلیمریزه

¹ Ion-exchange chromatography

² Resin

³ Hydrophobic

⁴ Acrylamid

شده با اتصالات عرضی^۱ است که دارای تعداد زیادی گروه های اسیدی یا بازی می باشد. اگر چه رزینها در آب غیر محلول است ولی حاوی گروههای فعال آب دوست می باشند و میل ترکیبی مختلفی با اجسام حل شده یونی دارند. محدود pH برای این کار مهم است زیرا در pH کمتر از ۵، رزین های اسیدی ضعیف به قدری کم تفکیک می شوند که تعویض یونی قابل صرف نظر می شود و بر عکس برای نوع بازی در pH بیشتر از ۹ صحت دارد (باقری، ۱۳۸۴). در جدول ۱-۲ انواع رزین های تبادل یونی و ترکیبات جداسازی شده توسط آن ها آورده شده است.

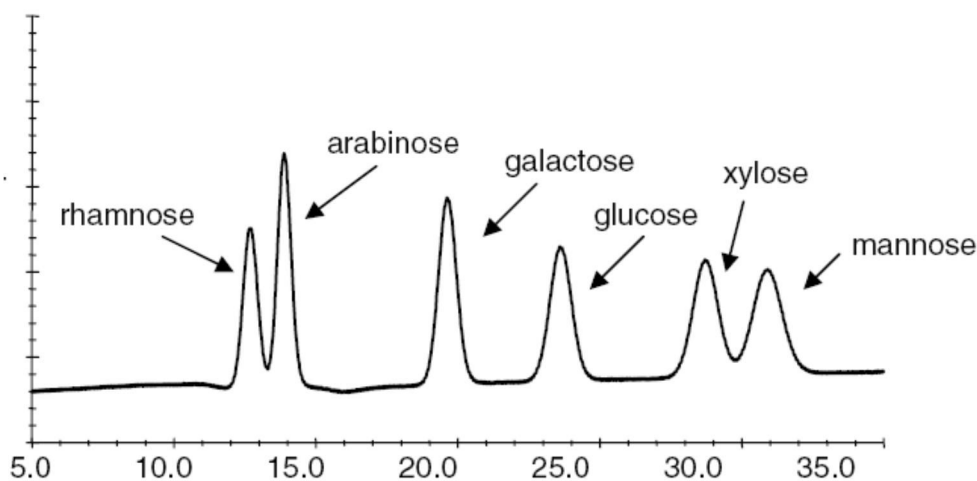
جدول ۱-۲: انواع رزین های تبادل یونی و ترکیبات جداسازی شده (باقری، ۱۳۸۴)

نوع رزین	طبیعت رزین	حدود pH موثر	موارد استعمال کروماتوگرافی
تعویض کاتیونی اسیدی قوی	پلی استرین سولفات	۱-۱۴	جداسازی جزء به جزء کاتیونها، مواد معدنی، لانتانیدها، ویتامین های B، پپتیدها
تعویض کاتیونی اسیدی ضعیف	پلی متاکریلات کربوکسیل دار	۱-۱۴	کاتیونها، مواد بیوشیمیایی، عناصر واسطه، آمینو اسیدها، بازهای آلی، آنتی بیوتیکها
تعویض آنیونی بازی قوی	پلی استرین با آمونیوم نوع چهارم، هیدروکسید سدیم	۰-۱۲	آنیونها، هالوژنها، آلكالوئیدها، کمپلکس های ویتامین B، اسیدهای چرب، پلی ساکاریدها
تعویض آنیونی بازی ضعیف	پلی استرین پلی آمین، یا فنل فرمالدهید، استات سدیم	۰-۹	کمپلکس های آنیونی، فلزات، آنیونها، باظرفیت مختلف، آمینو اسیدها، ویتامین ها، مونو و دی ساکاریدها

کروماتوگرافی تبادل یونی روشی ارزشمند برای آنالیز کربوهیدرات ها به شمار می رود. این نوع از کروماتوگرافی بر اساس این واقعیت است که کربوهیدرات ها در محیط قلیایی قوی یونیزه شده و

¹ Cross-link

قابلیت جداسازی پیدا می کنند. ستون های کروماتوگرافی تبادل یونی توسط یک رزین تبادل یون پوشیده می شوند. در سیستم تبادل یونی معمولا هیدروکسید سدیم به عنوان شوینده برای مونو و دی ساکاریدها استفاده می شود درحالیکه برای مولکول های بزرگتر از استات سدیم برای افزایش قدرت یونی بیشتر استفاده می شود. دتکتور پالس آمپرومتریک FAD جهت شناسایی در این روش به کار می رود. این آشکارساز تغییر جریان ناشی از احیاء شدن یا اکسیداسیون کربوهیدرات ها را در یک الکتروود از جنس طلا یا پلاتین اندازه گیری می کند (Cui, 2005). شکل ۱-۱۹ جداسازی و شناسایی قندهای آرابینوز، رامنوز، گلوکز، گالاکتوز، مانوز و زایلوز را توسط کروماتوگرافی تبادل یونی و آشکارساز FAD نشان می دهد.



شکل ۱-۱۹: جداسازی قندهای آرابینوز، رامنوز، گلوکز، گالاکتوز، مانوز و زایلوز به روش کروماتوگرافی تبادل یونی و آشکارساز FAD (Cui, 2005).

۱-۳-۶ معیارهای خلوص پلی ساکاریدها

خلوص پلی ساکاریدها را می توان به روش های مختلفی تعیین کرد. برای مثال، مقدار درصد نیتروژن میزان سطح آلودگی پلی ساکارید را به پروتئین نشان می دهد. از این روش برای پلی ساکاریدهای بتا - گلوکان، آرابینوگزیلان، سلولز، صمغ زانتان، ژلان، کاراگینان و آلژینات به دلیل داشتن سطح پایین آلودگی به پروتئین استفاده می شود ولی برای پلی ساکاریدهای که حاوی اتصالات کوالانسی پپتیدی

هستند مانند صمغ عربی و آرایینوگالاکتان ها مناسب نیست. ثبات در ترکیب پلی ساکاریدها و نسبت قند بعد از تکرار مراحل تصفیه نشان دهنده خلوص پلی ساکارید حاصل شده است. در نهایت پروفایل پیک های حاصل (تعداد، اندازه و تقارن پیک ها) از کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه و کروماتوگرافی تبادل یونی نیز می تواند بیانگر خلوص پلی ساکاریدها باشد (Cui, 2005).

۱-۳-۷ ترسیب پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدهای باقیمانده در محلول بعد از مرحله خالص سازی می توانند توسط الکل یا استن^۱ ترسیب شوند. در ترسیب پلی ساکاریدها با الکل میزان غلظت محلول و وزن پلی ساکارید موثر است. پلی ساکاریدها در غلظت های خیلی رقیق و وزن مولکولی پایین رسوب نمی کنند. معمولا ۳ یا ۴ برابر حجم محلول پلی ساکاریدی از اتانول با (غلظت نهایی ۷۱٪ یا ۷۶٪) استفاده می شود. سپس محلول پلی ساکارید برای اطمینان از حذف مواد با وزن مولکولی پایین، نمک ها یا محصولات تجزیه آنزیمی توسط کیسه های دیالیز، فیلتر شده و در نهایت با استفاده از روش انجمادی^۲ خشک می شود (Cui, 2005).

۱-۳-۸ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های شیمیایی

۱-۳-۸-۱ تعیین وزن مولکولی

تعیین وزن مولکولی پلی ساکاریدها با استفاده از تکنیک های مختلف انجام می شود که به سه دسته ترکیبی، نسبی و مطلق تقسیم می شوند:

✓ تکنیک های ترکیبی برای تعیین وزن مولکولی شامل غشاء اسمزی، تفرق نور استاتیک و تعادل رسوبی است. در این تکنیک نیازی به داشتن اطلاعات در مورد وزن مولکولی و

¹ Acetone

² Freeze Drying

کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای مولکولی تعیین شده نیست (Zimm, 1948).

✓ تکنیک نسبی بر خلاف تکنیک ترکیبی به داشتن اطلاعات در مورد وزن و ساختار مولکول و انجام کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای تعیین شده احتیاج دارد. کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه (SEC)^۱ و ویسکومتری^۲ روش هایی هستند که در این زیر مجموعه قرار دارند.

✓ تکنیک ترکیبی از ترکیب دو روش استفاده می شود، مثلاً استفاده از سرعت ترسیب همراه با تفرق نور دینامیک یا موارد دیگر (Carreher, 2000).

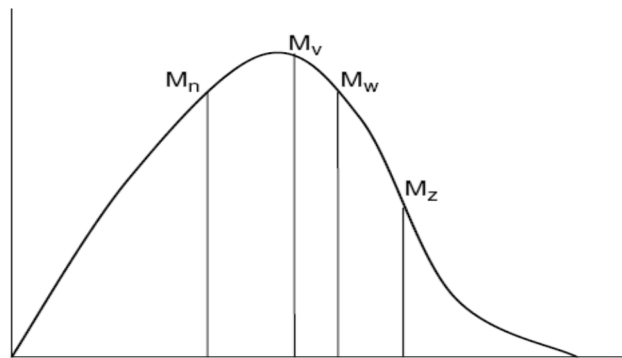
وزن مولکولی از شاخصه های اصلی پلی ساکاریدهاست و تعیین مقدار آن ارتباط مهمی با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پلی ساکاریدها دارد. پلی ساکاریدها پلی دیسپرس هایی در وزن مولکولی هستند به این معنی که هر پلی ساکارید شامل زنجیرهایی از تعداد مختلف واحدهای مونوساکاریدی هستند که توزیعی از وزن مولکولی در اختیار می گذارند. توزیع وزن مولکولی برای پلی ساکارید حاصله متفاوت است و بستگی به عوامل مختلفی مانند مسیر و محیط سنتز و همچنین شرایط استخراجی استفاده شده برای جداسازی پلی ساکارید دارد. چهار نوع آماری مختلف از میانگین وزن مولکولی که مورد استفاده قرار می گیرد شامل میانگین وزن مولکولی عددی (M_n)، میانگین وزن مولکولی وزنی (M_w)، میانگین وزن مولکولی Z (M_z) و میانگین وزن مولکولی ویسکوزیته (M_v) است (Harding, 1998).

بیشتر خصوصیات ترمودینامیکی پلی ساکارید به تعداد ذرات موجود که خود وابسته به میانگین وزن مولکولی عددی (M_n) هستند مرتبط است. اندازه ذرات پلیمر در زنجیر به میانگین وزن مولکولی وزنی (M_w) و وزن مولکولی میانگین Z (M_z) که توسط تکنیک ترسیب تعیین می شود مرتبط است و خصوصیات الاستیکی ذوب بیشترین نزدیکی را با این میانگین دارد. یک اندازه گیری مناسب برای

¹ Size Exclusion Chromatography

² Viscometry

مقدار وزن مولکولی در یک توزیع نسبت $(M_w)/(M_n)$ می باشد که اندیس پلی ساکارید نامیده شده است (شکل ۱-۲۰). بیشترین توزیع احتمالی برای یک پلیمر پلی ساکاریدی اندیس ۲ و اندیس مربوط به پلی ساکاریدهای خنثی بین ۱/۵ تا ۲ است. با استفاده از تکنیک های فرکشنی مانند کروماتوگرافی مولکولی براساس اندازه و فرکشن های ترسیب می توان فرکشن های پلی ساکاریدی با اندیس توزیع کم را بدست آورد (Carreher, 2000).



شکل ۱-۲۰: توزیع وزن مولکولی و میانگین وزن مولکولی برای یک سیستم با وزن مولکولی ناهمگن (Carreher, 2000).

۱-۳-۸-۲ تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکاریدها

برای تشخیص مونوساکاریدهای سازنده یک پلی ساکارید ابتدا باید پلی ساکارید پلیمر زدایی شود. پیوندهای گلیکوزیدی در حضور یک اسید قوی و دمای بالا از ساختار پلی ساکاریدها شکسته می شوند. برای شکستن هر پیوند گلیکوزیدی در طی واکنش یک مولکول آب مصرف می شود و همچنین خطر تخریب مونوساکارید توسط اسید داغ نیز وجود دارد. همه پیوندهای گلیکوزیدی با سرعت یکسان نمی شکنند و باید زمان مناسب برای هیدرولیز در نظر گرفته شود و تعادل بین این دو حالت لازم است. در واقع به یک هیدرولیز قوی با مدت زمان مناسب نیاز است تا واکنش به طور کامل انجام بگیرد ولی باعث تخریب نمونه نشود. اسید سولفوریک و اسید تری فلورواستیک معمولا برای این فرایند استفاده می شوند. برای هیدرولیز ترکیبات فیبری مانند سبوس گندم، کاه، سیب و نمونه های

سلولزی، اسید سولفوریک نسبت به اسید تری فلورواستیک ارجحیت دارد (Garleb et al., 1989).

اسید سولفوریک به سختی پس از فرایند هیدرولیز حذف می شود و حضور آن باعث اختلال در آنالیزهای بعدی خواهد شد ولی اسید تری فلورواستیک به علت فرار بودن به راحتی در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حذف می شود. فرایند هیدرولیز باید تحت نظارت باشد تا از تجزیه بیش از حد و شکستن پیوندهای مفید خودداری شود.

فرایند هیدرولیز تا جایی که همه قندها از پلی ساکارید آزاد شوند، ادامه می یابد. با افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز، قندهای آزاد شده تجزیه شده و غلظت مونوساکاریدها کاهش می یابد پس باید زمان و دمای هیدرولیز به شدت تحت کنترل باشد. پلی ساکاریدهای اسیدی مانند پکتین و قارچ های خاص به سختی توسط روش های مرسوم مانند استفاده از اسید سولفوریک و اسید تری فلورواستیک هیدرولیز می شوند که این مشکل از آنجا ناشی می شود که نوع پیوند ساختاری در قندهای اسیدی و خنثی فرق می کند و در نتیجه حساسیت آنها نسبت به فرایند هیدرولیز متفاوت است. اطلاعات کیفی و شناسایی قندها بعد از هیدرولیز توسط روش های کروماتوگرافی و انواع طیف سنجی تعیین خواهد شد (Cui, 2005).

۱-۳-۸-۳ تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی

روش های مختلفی برای تعیین نوع اتصالات گلیکوزیدی پلی ساکاریدها وجود دارد مانند متیلاسیون^۱، هیدرولیز اسیدی ناقص (ملایم)^۲ و اکسیداسیون که در ادامه شرح داده می شوند.

۱-۳-۸-۳-۱ متیلاسیون

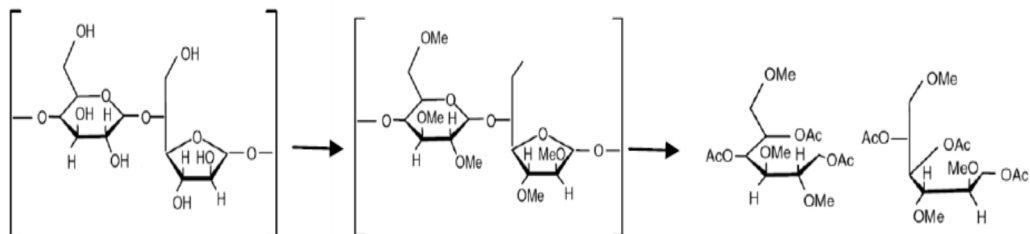
آنالیز متیلاسیون از روش های قدرتمند برای آنالیز کربوهیدرات ها است که شامل دو مرحله مشتق

¹ Methylation

² Partial(mild) acid hydrolysis

سازی شیمیایی و کروماتوگرافی مایع - گاز و اسپکتروسکوپی جرمی می باشد. آنالیز متیلاسیون پلی ساکاریدها شامل تبدیل گروه های هیدروکسیل آزاد به متوکسیل است. واکنش تبدیل گروه های هیدروکسیل به متوکسیل نیازمند یک محیط قلیایی و مهیا کننده گروه های متیل است در گذشته از اکسید نقره - یدید متیل و هیدروکسید سدیم - متیل سولفات به عنوان محیط قلیایی استفاده می شد (Haworth,1915& Purdie et al, 1903)

امروزه دی‌مسیل سدیم^۱ و یدید متیل به جای ترکیبات ذکر شده جایگزین شده اند. این روش ها بوسیله هیدروکسید سدیم در دی متیل سولفوکسید^۲ خشک (DMSO) اصلاح شده است (Hakomori,1964). شکل ۱-۲۱ واکنش متیلاسیون آلدوپیرانوز و آلدوفورانوز و تبدیل شدن به آلدتیول های مربوطه را نشان می دهد.



شکل ۱-۲۱: واکنش متیلاسیون آلدوپیرانوز و آلدوفورانوز و تبدیل شدن به آلدتیول های مربوطه (Cui, 2005).

برای اینکه واکنش متیلاسیون به خوبی انجام شود پلی ساکاریدها باید به طور کامل در دی متیل سولفوکسید حل شوند. به همین دلیل از شیکر ثابت و تیمار فراصوت در دماهای بالاتر از ۷۰°C استفاده می شود. اگر حلالیت بطور کامل نباشد منجر به متیلاسیون جزئی یا ناکامل می شود که متعاقباً منجر به شناخت ناصحیح از ساختار پلی ساکارید خواهد شد. متیلاسیون ناکامل معمولاً در بخش نامحلول پلیمر ایجاد می شود. پلی ساکاریدهای متیله شده با تقسیم شدن بین بخش های آب و کلرید متیلن یا توسط فیلتر بازیافت می شوند سپس پلی ساکاریدهای متیله شده در اسیدهای

¹ Dym syl sodium

² Dimethyl sulfoxide

معدنی هیدرولیز می شوند (Cui, 2005).

اسید تری فلورواستیک به دلیل حذف آسان از طریق تبخیر، اغلب برای این فرایند استفاده می شود. عموماً یک پلیمر متیله شده توسط اسید تری فلورواستیک ۰/۴ مولار در 100°C یا 120°C برای ۶ ساعت هیدرولیز می شود و سپس توسط فرایند تبخیر تحت بخار نیتروژن حذف می شود. وجود گاز بی اثر نیتروژن می تواند به جلوگیری از واکنش های شیمیایی نامطلوب کمک کند. بعد از فرایند هیدرولیز، pH ترکیب هیدرولیز شده باید به حالت خنثی برگردد که برای این کار کربنات باریم بمنظور خنثی کردن اسید سولفوریک مورد استفاده قرار می گیرد و سولفات باریم ترسیب شده توسط عملیات سانتریفیوژ و فیلتر کردن جداسازی شده و حذف شود.

مونوساکاریدهای حاصل از فرایند هیدرولیز توسط بورودئوترید سدیم^۱ تحت شرایط قلیایی احیا شده و به آلدتیول های مربوطه تبدیل می شوند که در نتیجه این واکنش، بورودئوترید سدیم یک اتم دوتریم روی موقعیت کربن شماره ۱ ایجاد می کند و از این طریق تشخیص اتم کربن شماره ۱ از اتم کربن شماره ۶ آسان می شود. بورودئوترید اضافی در اثر اضافه کردن اسید استیک به اسید بوریک تبدیل شده و همراه با متانول تبخیر می شود. آلدتیول های پاره ای متیله شده در نهایت توسط انیدرید استیک استیله شده و تبدیل به استات آلدتیول می شوند که در نهایت این ترکیبات فرار توسط کروماتوگرافی گازی و طیف سنجی جرمی آنالیز می شوند. تناسب زمان نگهداری و طیف جرمی در مورد هر استات آلدتیول با استانداردهای شناخته شده برای شناسایی واحدهای مونوساکاریدی و الگوی پیوندی مورد استفاده قرار می گیرند در حالیکه مساحت و پیک های کروماتوگرافی برای تعیین کمیت مونوساکاریدها استفاده می شوند (Taylor et al., 1972).

زمانی که پلی ساکاریدها شامل اسیدهای ارونیک باشند مانند رامنوگالاکتورانان ها از پکتین های گیاهی و پلی ساکاریدهای اسیدی دیگر، آنالیز متیلاسیون بسیار مشکل خواهد شد. شرایط قلیایی که

¹ Borodeuteride sodium

برای آنالیز متیلاسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌تواند باعث حذف بتا شود و علاوه بر این اسیدهای ارونیک بسیار به هیدرولیز مقاوم هستند و داده‌های مربوط به قندهای خنثی و پیوندهای اسیدهای ارونیک ممکن است در طی مدت آنالیز متیلاسیون از دست برود. این مشکل بالقوه با استفاده از کاهش شیمیایی گروه‌های کربوکسیل بر طرف می‌شود (Singthong et al., 2004).

۱-۳-۸-۳-۲ هیدرولیز اسیدی جزئی یا ملایم

تجزیه جزئی پلی ساکاریدها با استفاده از هیدرولیز اسیدی بر اساس این واقعیت می‌باشد که بعضی از پیوندهای گلیکوزیدی بیشتر از دیگر پیوندها حساس هستند. برای مثال حلقه‌های فورانوزیل و قندهای دئوکسی معمولاً دارای پیوندهای گلیکوزیدی ضعیفی هستند که به سرعت توسط اسیدها هیدرولیز می‌شوند. هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی ۶- دئوکسی هگزوزها تقریباً ۵ برابر سریع‌تر از هیدرولیز اتصالات در سایر هگزوزهای موجود در اطراف آن‌هاست. اگر یک پلی ساکارید شامل تعداد محدودی از پیوندهای گلیکوزیدی حساس باشد هیدرولیز جزئی آن شامل مخلوطی از مونوساکاریدها و الیگو ساکاریدها خواهد بود. شناسایی این محصولات یا باقیمانده اسکلت پلی ساکاریدی آن‌ها، اطلاعات با ارزشی را در مورد ساختار پلی ساکارید فراهم می‌کند. هیدرولیز اسیدی جزئی از پلی ساکاریدهای کاملاً متیله شده غالباً اطلاعات مفیدی را در مورد موقعیت پیوند الیگوساکاریدها به پلی ساکارید اصلی نشان می‌دهد (Cui, 2005). برای مثال یک پلی ساکارید شامل باقیمانده‌های د- گالاکتوپیرانوز و د- گالاکتوفورانوز می‌تواند به طور انتخابی در شرایط اسیدی ملایم بعد از متیلاسیون هیدرولیز شود. پیوندهای د- گالاکتوفورانوزیل که ترجیحاً در شرایط اسیدی ملایم هیدرولیز می‌شوند و محصولات این واکنش توسط بورودئوترید احیاء می‌شوند و سپس فرایند متیلاسیون با تری دئوتریومتیل یدید، تکرار می‌شود. یک گروه تری دئوتریومتیل در موقعیت اکسیژن شماره ۳ در د- گالاکتوپیرانوزیل می‌تواند بوسیله طیف سنجی جرمی قابل تعیین باشد. به همین ترتیب گروه‌های تری دئوتریومتیل احیاء شده در واحدهای انتهایی نیز تشخیص داده می‌شوند.

ترکیب اطلاعات ساختاری در مورد مشتقات دی ساکاریدی و روش های هیدرولیز اسیدی ملایم، اطلاعات مفیدی در مورد واحدهای تکرار شونده در ساختار پلی ساکارید فراهم می کند (Lindberg et al., 1975).

۱-۳-۸-۳-۳ اکسیداسیون

اکسایش پلی ساکاریدها و شناسایی ترکیبات حاصل از آن ها می تواند اطلاعات مفیدی در مورد نوع اتصالات، تعیین توالی و آرایش آنومری اتصالات گلیکوزیدی (آلفا یا بتا) در پلی ساکاریدها فراهم کند. در ادامه مهمترین روش های اکسیداسیون پلی ساکاریدها یعنی اکسایش پریودات^۱ و اکسایش با تری اکسید کرومیوم^۲ شرح داده شده است (Cui, 2005).

۱-۳-۸-۳-۴ اکسایش پریودات و تجزیه اسمیت

زمانی که یک گلیکوزید ساده توسط اسید پریودیک یا نمک های آن اکسید می شود در نهایت منجر به تولید دی آلدهید و اسید فرمیک می شود. دی آلدهید می تواند به وسیله بروهیدریدها احیاء شده و به الکل های مربوطه تبدیل شود. تولید نهایی یک استال است که این ترکیبات نسبت به اسید حساس هستند. این ترکیبات در واقع توسط اسیدهای معدنی رقیق در دمای اتاق هیدرولیز می شوند. در حالیکه واحدهای قندی باقیمانده در پیوندهای گلیکوزیدی نسبت به هیدرولیز اسیدی ضعیف مقاوم هستند. ترکیب اکسیداسیون پریودات، واکنش احیاء و هیدرولیز اسیدی ملایم تحت عنوان تجزیه اسمیت شناخته می شود (Lindberg et al., 1975).

۱-۳-۸-۳-۵ اکسایش با تری اکسید کرومیوم

تمام آلدوپیرانوزیدهای کاملاً استیله شده به فرم بتا - آنومر به آسانی توسط اکسید کرومیوم در حضور

¹ Oxidation periodate

² Chromium trioxide

اسید استیک اکسایش پیدا می کنند (Angyal et al., 1970). در مقابل آنومرهایی که دارای یک گلیکان متصل محوری به فرم آلفا هستند به کندی اکسید می شوند. واکنش های اکسیداسیون ترجیحاً برای تشخیص شکل آنومری قندها در الیگوساکاریدها استفاده می شوند (Lindberg et al., 1975). توالی قندها ممکن است بوسیله مقایسه نتایج آنالیز متیلاسیون با نمونه های اکسید شده تعیین شود. پیوندهای استری تشکیل شده در طول مدت اکسیداسیون با تری اکسید کرومیوم شکسته شده و با گروه های متیل در مرحله بعدی متیلاسیون جایگزین می شوند (Hakomori, 1964).

اخیراً روش اکسیداسیون تری اکسید کرومیوم همراه با FAB-MS¹ به طور موفقیت آمیزی برای تعیین فرم آنومری قندهای پیرانوزی در الیگوساکاریدها به کار می رود. در این حال فورانوزیدهای استیله شده توسط معرف های مستقل از فرم آنومریشان اکسید می شوند. تفاوت در واکنش بین اشکال آنومری از قندهای دی اسی بسیار کوچک است. علاوه بر این ممکن است بدلیل استیله نشدن کامل پلی ساکارید با مشکلاتی مواجه شویم. باقیمانده هایی شامل گروه های هیدروکسیل آزاد با اکسید کرومیوم صرف نظر از فرم آنومریشان اکسید می شوند (Lindberg et al., 1975).

۱-۳-۹ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های طیف سنجی

۱-۳-۹-۱ طیف سنجی NMR^۲

طیف سنجی NMR قدرتمندترین تکنیک فیزیکی و شیمیایی غیر تهاجمی برای تعیین ساختار پلی ساکاریدها است. این روش می تواند اطلاعات دقیقی از ساختار کربوهیدرات ها شامل شناسایی ترکیبات مونوساکاریدها، اشکال آنومری آلفا و بتا، الگوی پیوند ساختاری و توالی واحدهای قندی الیگوساکاریدها یا پلی ساکاریدها ارائه دهد. اساس طیف سنجی NMR بر پایه خصوصیات مغناطیسی

¹ Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

² Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

برخی از هسته های اتمی است که به عدد و جرم اتمی آنها وابسته است و با تعدادی حرکت اسپینی زاویه دار همراه می باشد. برای یک حرکت اسپینی خاص ممکن است یک هسته ایزوتوپی میدان مغناطیسی قوی ایجاد کند که در ادامه انرژی را از یک پالس فرکانس رادیویی قوی جذب کرده و متعاقباً این انرژی می تواند در زمانی که فرکانس رادیویی حذف شود آزاد گردد. آزاد شدن انرژی با یک سیگنال ضعیف همراه است که اطلاعات ساختاری را در مورد هسته های منفرد و اطراف آن ها نشان می دهد. با شناسایی و آنالیز سیگنال های آزاد شده، تغییرات شیمیایی (در حد PPM) و جفت شدن اسپین ها مشخص می شوند. مفید ترین هسته هایی که برای تحقیقات در زمینه کربوهیدرات ها به کار می رود C^{13} و H^1 هستند. در طیف سنجی NMR C^{13} و H^1 هر پلی ساکارید دارای طیف منحصر به فرد خود هستند. به عبارت دیگر طیف سنجی NMR اطلاعات ساختاری جالبی در مورد پلی ساکاریدها و الیگو ساکاریدها ارائه می دهد (Dabrowski, 1994).

۱-۳-۹-۲ طیف سنجی جذب مولکولی ماوراءبنفش و مرئی

اسپکتروفتومتری جذب مولکولی که اغلب اسپکتروسکوپی جذب نور یا فقط طیف سنج UV-VIS نامیده می شود بر مبنای اندازه گیری جذب امواج ماوراء بنفش نزدیک یا مرئی پایه گذاری شده است. در این روش تابش عبوری از نمونه نسبت به نمونه شاهد اندازه گیری می شود. این نسبت عبور برای محاسبه جذب استفاده می شود.

قانون بیر لامبر فرمول (۱-۱)

$$A = \text{Log } T$$

در شرایط مناسب جذب دقیقاً با غلظت ماده ارتباط پیدا می کند.

$$A = \epsilon_0 \cdot b \cdot c$$

C غلظت ماده و b طول مسیر نوری ϵ_0 ضریب جذب مولی A میزان جذب می باشد

۱-۳-۹-۲-۱ اجزاء تشکیل دهنده طیف سنجی ماوراء بنفش و مرئی

اسپکتروفتومترها یا فتومترها دارای یک یا چند دتکتورند و می توانند تک پرتوی یا دو پرتوی باشند که روش تک پرتوی عمومیت بیشتری دارد. این دستگاه ها ممکن است برای یک طول موج ثابت یا طول موج های متغیر طراحی شوند. منبع تابش دستگاه اغلب لامپ تنگستن - هالوزن است که به منظور دست یابی به طول موج پیوسته ناحیه مرئی یا مادون قرمز IR نزدیک به کار می رود. طول موج به وسیله عدسی و آینه به واحد انتخاب طول موج و بعد نمونه هدایت می شود. واحد انتخاب طول موج قبل از نمونه قرار داده می شود تا از تخریب حرارتی یا نوری نمونه جلوگیری شود. سل هایی که نمونه در آن قرار داده می شود باید استاندارد باشند برای مثال سل هایی با طول کم برای مواد با جذب بالا یا غلظت زیاد و سل هایی با طول زیاد برای مواد با جذب کم یا غلظت کم به کار می روند. سل های استوانه ای نیز برای اندازه گیری مواد با جذب خیلی کم یا گازها کاربرد دارند.

۱-۳-۹-۲-۲ کاربرد طیف سنجی ماوراء بنفش و مرئی

موقعیت طیفی از یک نوار جذبی حاصل از طیف سنج ماوراء بنفش بیانگر حضور و عدم حضور ویژگی های ساختاری و گروه های عاملی خاص در یک مولکول است. این روش طیف سنجی از ابزار اصلی برای آنالیز کیفی ترکیبات نیست و برای تشخیص دقیق از تکنیک های دیگر مثل NMR و IR و طیف سنجی جرمی استفاده می شود (باقری، ۱۳۸۴).

از طیف سنجی ماوراء بنفش برای شناسایی ساختارهای مولکول های مزدوج استفاده می شود. مدت زمان زیادی است که آزمون های رنگ سنجی برای قندهای ساده و پلی ساکاریدها و مشتقات آن ها به کار می رود. این ترکیبات بدلیل دارا بودن گروه های آزاد متیل در حضور معرف های فنل - اسید سولفوریک تشکیل رنگ قرمز تا نارنجی می دهند. رنگ ایجاد شده ثابت و بادوام است. جذب رنگ زرد- نارنجی در ۴۹۰ نانومتر برای هگزوزها و در ناحیه ۴۸۰ نانومتر مربوط به پنتوزها و اسیدهای

ارونیک است. با استفاده از منحنی های استاندارد از قبل تهیه شده برای بخشی از قندهای مورد آزمون می توان مقدار قند را تعیین کرد (Dubois et al., 1956).

۱-۳-۹-۳ طیف سنجی مادون قرمز

ناحیه قرمز تابش الکترومغناطیس، محدوده عدد موجی $10-1280 \text{ cm}^{-1}$ (یا طول موج 0.78 mm - 1000) را شامل می شود. معمولا این ناحیه را به سه قسمت زیر قرمز نزدیک، میانی و دور تقسیم می کنند. محدوده عدد موجی $10-200 \text{ cm}^{-1}$ ناحیه مادون قرمز دور، $4000-200 \text{ cm}^{-1}$ زیر قرمز میانی و $4000-1280 \text{ cm}^{-1}$ زیر قرمز نزدیک نام دارد. مهمترین کاربرد این ناحیه طیفی، مطالعات کیفی و آنالیز کمی کشاورزی، صنعتی و کنترل کیفیت محصولات است. طیف مادون قرمز معمولا جهت شناسایی ترکیبات آلی به کار می رود، چون طیف آن دارای پیک های زیادی می باشد که برای مقایسه مناسب است. اصول جذب تابش مادون قرمز بر اساس طیف جذبی، نشری و انعکاسی زیر قرمز برای گونه های مولکولی با فرض این که تمام آن ها از تغییر در انرژی به واسطه انتقال مولکول از یک تراز به تراز دیگری ناشی می شود می باشد. معمولا طیف سنجی بر حسب عدد موجی بیان می شود زیرا بین این کمیت و انرژی رابطه مستقیم وجود دارد. جذب تابش مادون قرمز در گونه های مولکولی که اختلاف انرژی بین حالات ارتعاشی و چرخشی خود دارند مشاهده می شود. فقط تحت این شرایط است که میدان الکتریکی تابش با مولکول بر هم کنش می کند و تغییری در دامنه حرکات مولکول ایجاد می شود، به عنوان مثال توزیع بار در اطراف یک مولکول مانند کلرید هیدروژن متقارن نیست و این به دلیل دانسیته الکترونی بیشتر کلر نسبت به هیدروژن بیشتر است. ممان دو قطبی با بزرگی اختلاف دو بار و فاصله بین آنها تعیین می شود و واحد آن دبای^۱ می باشد. یک مولکول قطبی هنگامی که ارتعاش می کند نوسانی در ممان دو قطبی آن ایجاد شده و میدانی به وجود می آید که این میدان با میدان الکتریکی تابش بر هم کنش می کند. اگر فرکانس تابش با فرکانس ارتعاش

¹ Debye

طبیعی مولکول جفت شود انتقال انرژی به مولکول صورت می گیرد. به طور مشابه چرخش مولکولهای نامتقارن حول مراکز جرم آن ها یک نوسان دو قطبی متناوب را که می تواند با تابش بر هم کنش کند به وجود می آورد. در اثر چرخش و ارتعاش گونه های جور هسته مانند O_2 یا N_2 هیچ تغییری در ممان دو قطبی آنها ایجاد نمی شود و در نتیجه جذب تابش زیر قرمز نیز در آن ها مشاهده نخواهد شد. نمونه ای که بوسیله دستگاه مادون قرمز بررسی می شود ممکن است به صورت گاز، محلول، مایع خالص، یا یک جامد معلق باشد. سل های مورد استفاده در طیف سنجی مادون قرمز معمولاً از سل هایی که در ناحیه ماوراءبنفش و مرئی استفاده می شوند باریک ترند.

یک تکنیک برای نمونه هایی جامد این است که یک میلی گرم یا مقدار کمتری از نمونه کاملاً آسیاب شده با حدود ۱۰۰ میلی گرم برمید پتاسیم خشک مخلوط می شود. مخلوط شدن در یک هاون چینی انجام می شود، سپس مخلوط در یک قاب فنری مخصوص در فشاری بین ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ پوند بر اینچ مربع، فشرده می شود تا یک صفحه شفاف بدست آید. سپس برای بررسی طیف بینی، صفحه در مسیر پرتو دستگاه قرار داده می شود. طیف سنجی مادون قرمز برای شناسایی ترکیبات آلی، معدنی و نمونه های بیولوژیکی به کار می رود. این طیف سنج برای تعیین گروههای عاملی در یک ترکیب آلی مورد استفاده قرار می گیرد. در ناحیه اثر انگشت، محدوده 1200 تا 8700 cm^{-1} تفاوت های کوچک در ساختار و اجزاء تشکیل دهنده یک مولکول باعث تغییرات بزرگی در توزیع پیک های جذبی می شود. اکثر پیوندهای یگانه در این ناحیه نوارهای جذبی تولید می کنند. (باقری، ۱۳۸۴).

طیف سنجی مادون قرمز اطلاعاتی در مورد گروه های عاملی موجود در مولکول مانند (COR)، COOR، CN، NO و غیره) فراهم می کند. طیف مادون قرمز برای تعیین موقعیت آنومری و بررسی پلی ساکاریدهای با پیوندهای آنومری همسان پیشنهاد می شود، بطوریکه پیوند C-H آنومری تاثیری بر نوع (واحد گلوکز) و وضعیت پیوند ندارد ولی همپوشانی جذب پیوندهای مشابه و مجاور هم در

بسیاری از واحدهای پلی ساکاریدها، منجر به ایجاد ابهام در تفسیر طیف IR می شود (Walter et al., 1988).

۱-۴ تاریخچه گیاه مریم گلی^۱

فراتر از یک هزار سال پیش گیاه مریم گلی به عنوان گیاه دارویی استفاده می شده است و از روزگاران کهن در مجموعه گیاهان طبی یونانی ها و رومی ها مورد شناخت و توجه خاص بوده است. به زبان فارسی در بعضی مناطق مریمی یا مریم گلی، در کتب طب سنتی و عربی مریمیه، شالبیه و مریمیه صغیره نام برده می شود. در قدیم مریم گلی را به عنوان درمان همه دردها می دانستند. ابتدا به عنوان داروی موثر برای معالجه نیش حشرات به عنوان ضد سم و همچنین به عنوان داروی مقوی برای آرامش روح و بدن و افزایش طول عمر به کار می رفته است. آثار شفا بخش این گیاه در معالجه بیماری ها در کتاب ها و نوشته های حکیمان طب سنتی روزگاران کهن نظیر تئوفراست^۲، فیلسوف یونانی و دیو سکوریدس^۳، طبیب یونانی (قرن اول پس از میلاد) و پلی نی^۴، حکیم رومی (اوایل قرن اول بعد از میلاد مسیح) به تفصیل آمده است. از قرن نهم این گیاه به اروپا راه یافت و به سرعت توسعه یافت و سپس وارد چین شد و برای معطر کردن انواع نوشیدنی ها مورد استفاده قرار گرفت. در قرن شانزدهم کشور انگلستان از دم کرده مریم گلی به عنوان چای استفاده می کردند و پس از آن در ۲۰۰ - ۳۰۰ سال اخیر این گیاه وارد آمریکا شد و به عنوان ادویه مورد استفاده قرار گرفت. در حال حاضر اسانس مریم گلی برای معطر کردن و خوشبو کردن گوشت های کنسروی و انواع سوسیس و گوشت مرغ و در عطر سازی به عنوان اسانس پایه برای مخلوط کردن با سایر اسانس ها مورد استفاده قرار می گیرد. همه ساله زمین های زراعی وسیعی در شبه جزیره بالکان، روسیه، آمریکا، ایتالیا و همچنین کشورهای اروپای مرکزی برای کشت مریم گلی اختصاص می یابد (احمدی مجد و همکاران، ۱۳۹۲).

¹ *Salvia*

² Theophraste

³ Dioscorides

⁴ Pliny

۱-۴-۱ معرفی گیاه (مریم گلی)

گیاه مریم گلی از بزرگترین جنس های تیره نعناعیان^۱، شامل حدود ۹۰۰ گونه علفی، بوته ای، چند ساله، به ندرت یک ساله تا دوساله می باشد، که اغلب به شکل معطر هستند و در مناطق گرم و معتدل جهان رشد می کنند. اعضای این جنس در منطقه مدیترانه، جنوب شرق آسیا و آمریکای مرکزی انتشار دارند ۵۸ گونه از این جنس در مناطق مختلف ایران یافت شده است که از این تعداد ۱۷ گونه بومی می باشند (Ebrahimabadi, 2010). کلمه Salvia از واژه یونانی به معنی شفا دهنده یا شفا بخش مشتق شده است و به کاربردهای داروئی چند گانه گیاهان این تیره اشاره دارد. به طور مختصر دو گونه مهم آن در ذیل توضیح داده شده است.

۱-۴-۲ گیاه مریم گلی معمولی^۲

گیاهی علفی و چند ساله است که ارتفاع آن به ۴۰ تا ۸۰ سانتی متر می رسد. دارای ساقه های چهار گوش بوده و قسمت های مختلف این گیاه دارای کرک های خاکستری رنگ است و برگ های این گونه مریم گلی بر خلاف گونه های دیگر بلند و به طول ۴ تا ۱۰ سانتی متر می باشد. نیزه ای شکل و به رنگ سبز متمایل به خاکستری هر دو طرف پوشیده از کرک های بسیار کوتاه است. گل های این گیاه خوشه ای بوده و مانند یک چتر بالای بوته را پر می کند. گل ها به رنگ آبی مایل به بنفش هستند براکته های رنگی برگ مانند اغلب تخم مرغی شکل هستند (شکل ۱-۲۲). گلدهی آن از تابستان تا پاییز ادامه دارد (احمدی مجد و همکاران، ۱۳۹۲).

^۱ Lamiaceae

^۲ Salvia officinalis



شکل ۱-۲۲: نمایی از گیاه مریم گلی معمولی (احمدی مجد و همکاران، ۱۳۸۶)

۱-۴-۳ گیاه مریم گلی ارغوانی^۱

مریم گلی ارغوانی از مهمترین گونه های این جنس و گیاهی پایا با ریشه های چوبی، ساقه راست و غیر منشعب به ارتفاع ۱۲-۵۵ سانتی متر، معمولا داری کرک های غده ای است. برگ های این گیاه ساده، متقابل، بیضی یا تخم مرغی، کنگره دار و به ابعاد $۱-۳/۵ \times ۳-۴/۵$ سانتی متر، گل آذین دارای ۴-۶ گل مجزا و دارای براکته، کاسه گل استکانی و دارای کرک های غده ای، جام گل لوله ای، نامنظم و به رنگ صورتی تا بنفش رنگ و به ندرت سفید، میوه ها به ابعاد $۳-۳/۵$ میلی متر و به رنگ قهوه ای تیره است (امیری، ۱۳۹۰). زمان گلدهی آن در فصل بهار طی ماه های اردیبهشت و خرداد است (شکل ۱-۲۳). بعضی از ترکیبات شیمیایی آن شامل دی ترپنوئیدها، نوردی ترپنوئیدها^۲، سالوین^۳، مولتین^۴، دی ترپن، نوردی سیتوکسین^۵ از عصاره این گیاه استخراج شده است (مظفریان، ۱۳۷۵).

¹ *Salvia multicaulis*

² Norditerpenoid

³ Salvin

⁴ Multien

⁵ NordiCytosin



شکل ۱-۲۳: نمایی از گیاه مریم گلی ارغوانی

۱-۵ ترکیبات شیمیایی گیاه مریم گلی ارغوانی

برگ و شاخه های گیاه مریم گلی ارغوانی دارای اسانس، موسیلاژ^۱، سالوین، فلاونوئید^۲ و ساپونین^۳ است. ترکیب اصلی اسانس روغنی این گیاه شامل ۱ و ۸ سینئول^۴، بورنئول^۵، توژون^۶، کامفور^۷ و پنین^۸ است. رنگ اسانس معمولاً زرد کم رنگ و مقدار آن در شرایط اقلیمی مختلف، متفاوت و بین ۰.۱٪ تا ۰.۵٪ است. این گیاه همچنین شامل ترکیبات تلخ مزه، مواد تاننی^۹، گلیکوزیدی و رزینی می باشد (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

بسیاری از گونه های مریم گلی ارغوانی به عنوان طعم دهنده در غذا و چای گیاهی و همچنین در صنایع آرایشی و بهداشتی، عطر سازی و داروئی استفاده می شوند. ترپنوئیدها^{۱۰} و فلاونوئیدها از

-
- 1 Mucilage
 - 2 Flavonoids
 - 3 saponin
 - 4 1, 8-Cineole
 - 5 Borneol
 - 6 Thujone
 - 7 Camphor
 - 8 Pinene
 - 9 Tanin
 - 10 Terpenoid

اجزای اصلی متابولیت های ثانوی گونه های مریم گلی ارغوانی می باشند. اسید های فنلی و مشتقات در تمامی گونه ها وجود دارند و در فعالیت زیستی متعدد شرکت می کنند. اسید کافئیک در بیوشیمی تیره نعنایان نقش محوری دارد و در گونه های مریم گلی ارغوانی، واحد سازنده انواع متابولیت های فنلی از مونومرهای ساده تا انواع فرآورده های الیگومری است. شکل های تریمر و تترامر اسید کافئیک به علت داشتن خصوصیات منحصر به فرد زیستی متعددی شرکت می کنند. تریمرهای مشتق شده از اسید کافئیک، بزرگترین گروه متابولیت ثانوی را در مریم گلی ارغوانی تشکیل می دهند. مشتقات اسید کافئیک فراوان ترین ترکیبات آب دوست گونه های مریم گلی ارغوانی هستند که دارای فعالیت زیستی متنوع ضد اکسایشی، ضد تشکیل پلاکت، ضد توموری و ضد ویروسی هستند. مقدار تولید این ترکیبات در اندام هوایی به طور گسترده ای به عوامل ژنتیکی و شرایط محیطی بستگی دارد (Min-Hui et al., 2008).

۱-۶ خواص درمانی و کاربردی مریم گلی ارغوانی

همانطور که اشاره شد گیاه مریم گلی ارغوانی به عنوان دارو در زمان های قدیم مورد استفاده قرار گرفته است. اطباء قدیم این گیاه را در درمان ضعف اعصاب، خستگی عمومی، سرگیج های عصبی، لرزش اندام ها، تشنج و فلج موثر می دانستند. همچنین برای معالجه یبوست، وبا و انواع تب ها و اختلالات کبدی و صرع و فلج استفاده می کردند. این گیاه را مقوی و مولد خون تازه می دانستند و مردم در گذشته از آن به عنوان ماده عامل انعقاد خون و نیز داروی ضد تعریق استفاده می کرده اند. از عصاره مریم گلی ارغوانی برای شستشوی دهان جهت مداوای برخی بیماری های حلق و حنجره، جوش های داخل دهان و بعضاً آفت دهان، گلو درد بدلیل خاصیت ضد عفونی کنندگی استفاده می شود. جوشانده غلیظ این گیاه برای دردهای مفصلی، رماتیسم و حتی راشیتیسسم کودکان بسیار مفید و موثر است. این گیاه ضد نفخ بوده و به هضم غذا کمک می کند. ترکیبات موجود در این گیاه موجب جلوگیری و معالجه آلزایمر و کاهش قند خون در بیماران دیابتی می شود. اثر ضد باکتریال و ضد قارچ

مریم گلی ارغوانی بر طیف وسیعی از باکتری ها مانند سودوموناس^۱ و آسپرژیلوس^۲ گزارش شده است. عصاره هیدرو الکلی مریم گلی ارغوانی بر باکتری های عامل پوسیدگی دندان اثر بازدارندگی رشد دارند و همچنین این عصاره باعث جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس^۳ روی مغز پسته می شود. با توجه به جنبه های اقتصادی اهمیت کنترل آلودگی به قارچ های مولد توکسین^۴ در مغز پسته، بکار گیری عصاره مریم گلی گامی بسیار مفید موثر می باشد (احمدی مجد و همکاران، ۱۳۹۲).

شهرت گونه های مریم گلی ارغوانی به علت خواص دارویی آن ها می باشد و در طب سنتی برای درمان سرماخوردگی جراحی ها و عفونت های پوستی، سردرد، کم خونی مغزی، اختلال حافظه، و همچنین هیپاتیت استفاده می شوند (Min-Hui et al., 2008). گیاه مریم گلی میلیتورھیزا بانگ^۵ گیاهی داروئی در طب سنتی چین است که به نام دنشن^۶ شناخته می شود چون به رنگ قرمز روشن است. این گیاه در ژاپن و دیگر کشورهای آسیایی برای درمان بیماریهای قلبی عروقی، مغزی، بهبود عملکرد کلیه و کبد به کار می رود. از این گیاه به صورت آمپول، قطره چکان و غیره دارو تهیه می شود (Wang et al., 2006).

¹ *Pseudomonas*

² *Aspergillus*

³ *Aspergillus Flavus*

⁴ Toxin

⁵ *Salvia miltiorrhiza bung*

⁶ Danshen

فصل دوم

بررسی منابع

۲ بررسی منابع

۲-۱ استخراج، خالص سازی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها

مولایی و همکاران در سال ۲۰۱۸ موفق به جداسازی پلی ساکارید محلول در آب از صمغ تراوشی از درخت بادام کوهی^۱ توسط استخراج با آب داغ °C ۷۵ شدند. خالص سازی پلی ساکارید خام توسط ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل - سلولز و ستون سفاکریل S-400 انجام گرفت. ترکیب مونوساکارید شناسایی شده از این صمغ یک آرابینو گالاکتان شامل رامنوز، آرابینوز، زایلوز، گالاکتوز به نسبت مولی ۱: ۱: ۲۰: ۵/۲: ۱۷/۹ بود. مقدار اسید ارونیک موجود در پلی ساکارید خالص حدود ۰.۶٪ بود. ساختار پلی ساکارید خالص توسط هیدرولیز ناقص اسیدی، متیلاسیون، GC-MS، اکسیداسیون پرودات و تجزیه اسمیت، آنالیز FTIR و NMR بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که صمغ مذکور دارای اسکلت اصلی متشکل از واحدهای بتا-د- گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۳، آلفا- ال- آرابینوفورانوز با اتصال ۱ و ۱ به ۳، و زنجیره جانبی که در موقعیت کربن شماره ۳ و ۶ بتا گالاکتو پیرانوز منشعب شده اند، شامل بتا-د-زایلو پیرانوز با اتصالات ۱ به ۳، آلفا-ال- آرابینو فورانوز با اتصالات ۱ و ۱ به ۳، آلفا-ال رامنو پیرانوز با اتصالات ۱ به ۶، بتا-د- گالاکتوپیرانوز با اتصال ۱، بتا-د- گلوکورونیک اسید با اتصال ۱ به ۶ و بتا-د- گالاکتو پیرانوز با اتصال ۱ بود (Molaei et al., 2018).

پلی ساکارید جدید محلول در آب توسط جهان بین در سال ۲۰۱۸ از ریشه گیاه چوبک سوزنی^۲ با وزن مولکولی ۲۳/۲ کیلو دالتون توسط آب گرم جداسازی شد. خالص سازی پلی ساکارید خام توسط ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل - سلولز و کروماتوگرافی تبادل یونی و کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی و سفادکس G-50 انجام گرفت. نتایج نشان داد پلی ساکارید حاصل شامل گلوکز، گالاکتوز و آرابینوز با نسبت مولی ۱/۶: ۵/۱: ۱ است. با استفاده از آنالیزهای شیمیایی و دستگاہی

¹ *Amygdalus scoparia* Spach

² *Acanthophyllum acerosum*

مانند هیدرولیز ناقص اسیدی، متیلاسیون، اکسیداسیون تجزیه اسمیت، GC-MS، FTIR و NMR مشخص شد که اسکلت اصلی پلی ساکارید مذکور از واحدهای آلفا-د-گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۶ تشکیل شده است. علاوه بر آن در موقعیت کربن شماره ۲ آلفا-د-گلوکورونیک اسید با اتصال ۱ و در موقعیت کربن شماره ۳ آلفا-د-گالاکتوپیرانوز با اتصال ۱ و بتا-ال-آرابینوپیرانوز با اتصالات ۱ و ۱ به ۳ منشعب شده است (Jahanbin, 2017).

جهان بین و همکاران در سال ۲۰۱۷ موفق به جداسازی پلی ساکارید جدید محلول در آب با وزن مولکولی ۵۲/۱ کیلو دالتون توسط استخراج با آب گرم و خالص سازی به وسیله ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل - سلولز و ستون سفادکس G-100 از ریشه های سریش زرین^۱ شدند. نتایج آنالیز شیمیایی و دستگاهی شامل متیلاسیون، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، FTIR، GC-MS و NMR تک بعدی و دوبعدی مشخص کرد که اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید مذکور از باقیمانده های آلفا-د-گالاکتوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۶ و زنجیره های جانبی آن از آلفا-د-مانوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۳، آلفا - ال - آرابینوفورانوز با اتصالات ۱ و ۱ به ۳ که در موقعیت کربن شماره ۳ منشعب شده اند، تشکیل شده است (Jahanbin et al., 2017).

پلی ساکارید جدیدی توسط صحراگرد و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ریشه تمشک نارونی^۲ با وزن مولکولی ۷۹۰۰ دالتون جداسازی شد. استخراج توسط آب ۷۰°C و مراحل خالص سازی توسط ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل - سلولز و ستون سفادکس G-100 انجام گرفت. نتایج آزمایشات مختلف نشان داد که پلی ساکارید مذکور از گلوکز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک تشکیل شده است. ساختار پلی ساکارید خالص بر اساس متیله کردن، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، FTIR و NMR مشخص شد. اسکلت اصلی پلی ساکارید از آلفا-د-

¹ *Eremurus stenophyllus*

² *Rubus anatolicus*

گلوکوپیرانوز با اتصال ۱ به ۴ و شاخه های جانبی آن از آلفا-د- گالاکتوپیرانوز با اتصال ۱ و آلفا-د- گلوکورونیک اسید با اتصال ۱ در موقعیت کربن شماره ۶ تشکیل شده بود (Sahragard et al., 2017).

مایتی^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی روی پلی ساکاریدهای محلول در آب حاصل از قارچ تاچه ای بزرگ^۲ نشان دادند که پلی ساکاریدهای آن دارای گلوکان های جدید با وزن مولکولی $1/48 \times 10^5$ است. استخراج توسط آب داغ با دمای 100°C انجام شد و به دنبال آن فرایند خالص سازی با استفاده از فیلتر لوله ای سلولزی و ستون کروماتوگرافی سفاروز 6B صورت گرفت. ساختار پلی ساکاریدی مذکور توسط هیدرولیز اسیدی، متیلاسیون و آزمایش تجزیه اسمیت، آزمایش (1D/2D) NMR مشخص شد. نتایج نشان داد که ساختار اصلی این گلوکان متشکل از بتا - د - گلوکوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۶ و آلفا - د - گلوکوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۶ و ۱ به ۴ است. علاوه بر آن باقیمانده های بتا - د - گلوکوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۳ و آلفا - د - گلوکوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۴ در موقعیت کربن شماره ۶ منشعب شده اند (Maity et al., 2017).

پلی ساکارید جدیدی توسط منگ^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۶ از قارچی به نام گریفولا فراندوسا^۴ جداسازی شد. استخراج توسط آب با دمای 80°C انجام گرفت. کروماتوگرافی مایع و آنالیز مونوساکاریدی نشان داد که این پلی ساکارید از واحدهای رامنوز، زایلوز، مانوز و گلوکز به نسبت مولی ۱، ۱/۰۴، ۱/۱۱، ۶/۲۱ تشکیل شده است (Meng et al., 2016).

ژانگ^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی بر روی ریشه گیاه ماکا (لیپیدیم مینی^۶) موفق به جداسازی پلی ساکارید آن به روش استخراج با آب جوش شدند. آنالیزی ساختاری نشان داد که وزن مولکولی میانگین این پلی ساکارید ۱۱/۳ کیلو دالتون و شامل آرابینوز به مقدار ۲۶/۲۱٪، مانوز ۱۱/۸۱٪، گلوکز

¹ Maity

² *Meripilus giganteus*

³ Meng

⁴ *Grifola frondosa*

⁵ Zhang

⁶ *Lepidium meyenii*

۵۳/۶۶٪، گالاکتوز ۸/۳۲٪ است. با استفاده از آنالیز متیلاسیون، اکسیداسیون پریودات، تجزیه اسمیت و آنالیز NMR مشخص شد که ساختار آن از پیوندهای اصلی آلفا - ال - آرابینوز با اتصالات ۱ به ۵ و آلفا - ال - مانوز با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۲ و ۶ و آلفا - ال - گلوکز با اتصالات ۱، ۱ به ۴ و ۱ به ۶ و بتا - ال - گالاکتوز با اتصالات ۱ به ۶ تشکیل شده است (Zhang et al., 2016).

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و آنالیز عنصری صمغ مترشحه از گیلان شیرین یا پرونوس آویوم^۱ توسط شعبانی^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۶ مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. این صمغ بطور متوسط دارای ۷۵/۱۴٪ کربوهیدرات، ۱۱/۳٪ اسیدهای اورونیک، ۱/۱۱٪ پروتئین، ۷/۵۳٪ محتوی رطوبت و ۳/۱۲٪ خاکستر بود. میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید اصلی موجود در این صمغ 1.46×10^5 دالتون اندازه گیری شد. پلی ساکاریدهای اصلی این ترکیب از چهار مونوساکارید به نام مانوز، آرابینوز، گالاکتوز، زایلوز با نسبت مولی ۱، ۱۴/۷، ۷/۱، ۲/۱۴ تشکیل شده است. آنالیز FTIR حضور گروه های کربوکسیل و هیدروکسیل و پیوندهای گلیکوزیدی را نشان داد (Shabani et al., 2016).

رضوی و همکاران^۳ در سال ۲۰۱۶ با تحقیق و پژوهش روی ساختار پلی ساکاریدی موسیلاژ دانه بالنگوی شیرازی^۴ دست یافتند که این ترکیب شامل پروتئین ۷۵/۸۷٪، کربوهیدرات و اسیدهای ارونیک ۲۰/۳۳٪ و خاکستر به میزان ۲/۷۱٪ است. آنالیز مونوساکاریدی این صمغ حضور ۳۷/۸۸٪ آرابینوز، ۳۳/۵۴٪ گالاکتوز، ۱۸/۴۴٪ رامنوز، ۶/۰۲٪ زایلوز و ۴/۱۱٪ گلوکز را نشان داد. وزن مولکولی ترکیب مذکور 1.294×10^6 دالتون بود. آنالیز FTIR گروه های کربوگسیل که ممکن است جایگاهی برای اتصال یون باشند را مشخص کرد (Razavi et al., 2016).

در سال ۲۰۱۶ پتانایاک^۵ و همکاران با استفاده از استخراج توسط آب جوش و طی کردن مراحل

¹ *Prunus avium*

² Shabani

³ Razavi

⁴ *Lallemantia royleana*

⁵ Pattanayak

خالص سازی و در نهایت انجام آزمایشات هیدرولیز اسیدی، آنالیز متیلاسیون، اکسیداسیون پریودات، آزمایش (1D/2D) NMR روی پلی ساکاریدهای قارچ ترافل توبر^۱ یا قارچ دنبل نشان دادند که این قارچ از مونوساکاریدهای د- گلوکز، د- گالاکتوز و ال- فوکوز، با نسبت مولکولی به ترتیب ۴ : ۳ : ۱ تشکیل شده است. ساختار اصلی این پلی ساکارید تشکیل شده از آلفا - د- گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۶ و ۱ به ۴، بتا - د- گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۶ و ۱ به ۴، بتا - د- گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۴ و ۱ به ۶ که از آن باقیمانده های آلفا - د- گلوکوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۴ در موقعیت کربن شماره ۶ منشعب شده که در انتها به ال- فوکوپیرانوزیل ختم می شود. همچنین انشعاب مشابهی در موقعیت کربن شماره ۶ وجود دارد که در انتها به آلفا - د- گالاکتوپیرانوزیل ختم می شود (Pattanayak et al., 2016).

گانگ^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۶ موفق به جداسازی پلی ساکارید جدید از برگ گیاه لیسیموم بارباروم^۳ که به عنوان دارو در آسیا مورد استفاده قرار می گیرد شدند. استخراج با آب مقطر در دمای ۸۰°C صورت گرفت. آن ها توسط آنالیز متیلاسیون، هیدرولیز جزئی اسیدی، تجزیه اسمیت و (1D/2D) NMR و اسپکترومتری جرمی بر پایه یونش اکترونی پاششی مشخص کردند که این پلیمر یک پلی ساکارید بزرگ منشعب است که دارای اسکلت اصلی گالاکتوز با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۴ با انشعاب در موقعیت کربن شماره ۶ هستند. این انشعابات گالاکتوزها با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۴، آرابینوز با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۵ و رافینوز با اتصالات ۱ به ۴ بودند (Gong et al., 2016).

هی^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۶ موفق به جداسازی پلی ساکارید محلول در آب از قارچ صدفی طلایی^۵ شدند. استخراج توسط آب داغ انجام گرفت و سپس این پلی ساکارید با استفاده از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی و ژلی جداسازی شد. پلی ساکارید مذکور دارای وزن مولکولی متوسط ۱۰^۴ × ۲/۷۴ دالتون بود. آنالیز متیلاسیون و NMR تک بعدی و دو بعدی حضور پلی ساکارید ۳ - ۰ -

¹ *Truffle tuber*

² Gong

³ *Lycium barbarum*

⁴ He

⁵ *Pleurotus citrinopileatus*

متیلات - آلفا - گالاکتوپیرانان شامل گالاکتوز و ۳ - ۰ - متیل گالاکتوز و گلوکز با نسبت مولکولی ۳:۱:۶ را نشان داد (He et al., 2016).

ژو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۶ به تحقیق و انجام آزمایش روی ریشه گیاه بارهنگ برگ پهن^۲ پرداختند. استخراج به روش التراسونیک با آب در دمای بین ۳۰°C تا ۷۰°C انجام گرفت و بعد از خالص سازی با استفاده از ستون سفاروز CL-4B و انجام آنالیز FT-IR و NMR نشان دادند که ساختار اصلی پلی ساکارید این گیاه از ۱ به ۶ آلفا - دی - گلوکان تشکیل شده است و همچنین وزن مولکولی آن حدود $10^5 \times 3/26$ دالتون می باشد (Zhu et al., 2016).

یان^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۶ موفق به جداسازی هتروپلی ساکاریدهای موجود در قارچ فلینوس لینتئوس^۴ شدند. استخراج توسط آب ۹۵ °C انجام شد و برای فرایند خالص سازی از کروماتوگرافی ستون های جریان سریع سفاروز DEAE و سفاکریل S-400 HR استفاده شد. این محققین با انجام آزمایشات مختلف مانند متیلاسیون، FTIR، NMR، روی قارچ مذکور به این نتیجه رسیدند که هترو پلی ساکاریدهای طبیعی در این نوع قارچ وجود دارد که ترکیبی از گلوکز و گالاکتوز، با نسبت مولی ۸/۹: ۱ و وزن مولکولی ۲۹۰۰۰۰ کیلو دالتون است. ساختار پلی ساکارید متشکل از ۱ به ۴ آلفا - دی - گلوکوپیرانوز به عنوان شاخه اصلی بود و شاخه جانبی آن از ۱ به ۳ آلفا - دی - گالاکتوپیرانوزیل متصل به موقعیت شماره ۶، همراه با آلفا - دی - گلوکو پیرانوزیل در انتها تشکیل شده بود (Yan et al., 2016).

در سال ۲۰۱۶ کارلاتو^۵ و همکاران با استفاده از فرکشن های متوالی بوسیله الترافیلتراسیون موفق به جدا سازی پلی ساکارید از برگ گیاه بابا آدم شدند. فرایند استخراج توسط آب تحت شرایط رفلاکس

¹ Zhu

² *Polygonum multiflorum*

³ Yan

⁴ *Phelinus linteus*

⁵ Carllotto

در دمای زیر 40°C انجام شد. آنالیز پلی ساکارید با استفاده از روش کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا صورت گرفت. نتایج نشان داد که این پلی ساکارید متشکل از اسید گالاکتورونیک، گالاکتوز، آرابینوز، رامنوز، گلوکز و مانوز با نسبت های مولی ۷:۴:۲:۱:۲:۱ و وزن مولکولی ۹۰۰۰۰ گرم بر مول است. همچنین با استفاده از NMR و آنالیز متیلاسیون نشان دادند ترکیب اصلی پلی ساکارید مذکور رامنو گالاکتورانان نوع ۱ می باشد و زنجیر های جانبی منشعب شده از آرابینو گالاتان های نوع ۱ و ۲ و آرابینان تشکیل شده است (Carlotto et al., 2016).

جینگان^۱ یک قارچ خوراکی لذیذ با ارزش غذایی بالاست که توسط لیو^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۴ مورد بررسی قرار گرفت. آن ها از طریق آزمایشات مختلف پلی ساکاریدهای موجود در این قارچ را استخراج و ساختار زنجیرهای آن را شناسایی کردند. استخراج توسط آب در دمای 90°C انجام گرفت و ترکیبات مونوساکاریدی با استفاده از کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. نتایج نشان داد که ساختار پلی ساکارید قارچ مذکور عمدتاً از گلوکز و مقدار کمی زایلوز تشکیل شده است. اسکلت اصلی آن شامل بتا گلوکان با اتصالات ۱ به ۳ همراه با شاخه های جانبی بتا گلوکوزیل با اتصالات ۱ به ۶ بود. آنالیز ساختاری شکل مارپیچ سه گانه را برای این پلی ساکارید مشخص کرد. همچنین پلی ساکارید دارای خواص آنتی اکسیدانی و قادر به مهار رادیکال های آزاد بود (Liu et al., 2014).

ترکیبات شیمیایی صمغ الثو^۳ رزین از فرولا گاموسا^۴ که از مناطقی در ایران جمع آوری شده بود توسط جلالی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج توسط اتانول انجام شد و فرایند تبخیر حلال در 40°C صورت گرفت. آنالیز شیمیایی این صمغ ساختار آرابینوگالاکتان همراه با ترکیبات پروتئینی را ارائه داد و نشان داد که وزن مولکولی آن ۳۰ کیلو دالتون بود. همچنین کروماتوگرافی طردی و NMR تک بعدی و دو بعدی مشخص کرد که اسکلت اصلی این صمغ از

¹ Jinqian

² Liu

³ Oleo

⁴ *Ferula gummosa*

باقیمانده های بتا - د - گالاکتوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۳ و ۱ به ۳ و ۶ تشکیل شده است و عمدتاً انشعابات به صورت آلفا - ال - آرابینوفورانوزیل و باقیمانده های بتا - د - گلوکورونوپیرانوزیل در انتها می باشد (Jalali et al., 2011).

نیو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه روی پلی ساکاریدهای ریشه گیاه گون ممبراناسه^۲ دریافتند که این پلی ساکارید وزن مولکولی معادل با دکستران در حدود $10^4 \times 2/07$ دالتون دارد. استخراج توسط آب 80°C انجام شد. آنالیز اکسیداسیون پرپودات و اسپکتروسکوپی یک بعدی و دو بعدی نشان داد اسکلت اصلی از گلوکز با واحدهای تکراری از اتصالات ۱ به ۴ و انشعابات با اتصالات ۱ به ۶ در هر ده واحد باقیمانده تشکیل شده است (Niu et al., 2011).

پلی ساکارید جدید محلول در آب گیاه زیزیپوس جوجوبا^۳ یا درختچه عناب توسط لی^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۱ جداسازی شد. بعد از استخراج پلی ساکارید توسط آب در دمای 80°C فرایند خالص سازی با استفاده از ستون DEAE تبادل یونی سفاروز CL - 6B و ستون کروماتوگرافی سفادکس - G 100 و ستون کروماتوگرافی ژلی با کارایی بالا انجام گرفت. نتایج نشان داد که این پلی ساکارید از ال - رامنوز، د - آرابینوز و د - گالاکتوز با نسبت های مولی ۱:۲:۸ تشکیل شده است. وزن مولکولی پلی ساکارید در حدود $10^5 \times 1/4$ دالتون تخمین زده شد. آنالیز متیلاسیون، هیدرولیز جزئی با اسید و آنالیز اسپکتروسکوپی NMR مشخص کرد که ساختار اسکلت اصلی زنجیر پلی ساکارید مذکور از باقیمانده های د - گالاکتورونوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۴، همراه با باقیمانده های ال - رامنوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۲ و ۱ به ۴ تشکیل شده است. همچنین زنجیرهای جانبی از آرابینوفورانوزیل و گالاکتوپیرانوزیل به موقعیت اکسیژن شماره ۴ رامنوپیرانوزیل در زنجیر اصلی متصل شده اند (Li et al., 2011).

¹ Niu

² *Astragalus membranaceus*

³ *Zizyphus jujuba*

⁴ Li

ژو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه روی ریشه گیاه گون^۲ دریافتند که ریشه این گیاه از دو نوع پلی ساکارید تشکیل شده است. استخراج توسط محلول اکسید کلسیم در دمای ۱۰۰°C انجام شد. پلی ساکاریدهای آن با الکل اتیلیک ترسیب شدند و فیلتراسیون و خالص سازی نیز توسط ستون سفادکس A-25 - DEAE و سفادکس G-100 انجام شد. وزن پلی ساکارید نوع اول $10^6 \times 4/77$ و پلی ساکارید نوع دوم $10^3 \times 8/68$ بود. هر دوی آن ها به طور عمده از گلوکز و مقدار کمی آرابینوز و زایلوز تشکیل شده بودند. FTIR، متیلاسیون، اکسیداسیون پرپودات، NMR (کربن ۱۳ و هیدروژن ۱) در آنالیز ساختاری این ترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که شکل ساختاری این دو پلی ساکارید مشابه یکدیگر است و زنجیر اصلی آن ها به صورت آلفا - گلوکز با اتصالات ۱ به ۳ و مقدار کمی هم به صورت آلفا - گلوکز ۱ به ۴ و ۱ به ۶ می باشد و زنجیرهای جانبی آن ها از آرابینوز و زایلوز تشکیل شده است (Zhu et al., 2011).

یک صمغ جدید توسط جهان بین و همکاران در سال ۲۰۱۱ از ریشه های گیاه چوبک تماشایی^۳ بوسیله استخراج با آب داغ در دمای ۶۰°C جداسازی شد. برای خالص سازی از ستون های کروماتوگرافی DEAE سلولز و سفادکس G-100 استفاده شد. آنالیز مونوساکاریدهای این صمغ توسط متیلاسیون، کروماتوگرافی GC-MS، FTIR، اکسیداسیون پرپودات، هیدرولیز اسیدی جزئی، تجزیه اسمیت و NMR انجام گرفت. نتایج نشان داد که ساختار زنجیر اصلی آن از آلفا - گالاکتوز با اتصالات ۱ به ۶ می باشد که در موقعیت کربن شماره ۲ زنجیر جانبی آلفا - گلوکز با اتصالات ۱ قرار دارد و همچنین در موقعیت کربن شماره ۳ زنجیر جانبی آلفا - گالاکتوز با اتصالات ۱ و آلفا - آرابینوز با اتصالات ۱ به ۳ متصل شده اند. (Jahanbin et al., 2011).

کامورا^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از استخراج آبی و فرایند خالص سازی دو نوع پلی

¹ Zhu

² *Astragalus*

³ *Acanthophyllum bracteatum*

⁴ Komura

ساکارید موجود در قارچ آگاریکوس برازیلینیس^۱ را جداسازی کردند. پلی ساکارید نوع اول وزن مولکولی $19/4 \times 10^3$ مول بر گرم و پلی ساکارید نوع دوم وزن مولکولی حدود $31/1 \times 10^3$ گرم بر مول داشت. پلی ساکارید نوع اول حاوی زنجیر اصلی از آلفا - د - گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۶ بود که در موقعیت کربن شماره ۲ با انتهای غیر احیا کننده از واحدهای آلفا - ال - فوکوپیرانوز جایگزین شده است. پلی ساکارید نوع دوم ساختاری مشابه با پلی ساکارید نوع اول داشت با این تفاوت که در بعضی قسمت ها گروه های هیدروکسیل شماره ۳ متیله شده بود. بعلاوه ۲/۵٪ واحدهای بتا - د - گالاکتوپیرانوز غیر احیا کننده در انتها داشت. (Komura et al., 2010).

استخراج آبی و قلیایی در دمای 100°C از پلی ساکارید قارچ هترودرمیا آبسکوراتا^۲ توسط پیرا^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت. آزمایش هیدرولیز اسیدی، متیلاسیون و آنالیز اسپکتروسکوپی NMR نشان داد که ساختار پلی ساکاریدی این قارچ شامل زنجیر اصلی از واحدهای آلفا - د - مانوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۶ است. در موقعیت اکسیژن شماره ۲ آلفا - د - گلوکوپیرانوزیل و آلفا - د - مانوپیرانوزیل و در موقعیت اکسیژن شماره ۴ گروه های آلفا - د - مانوپیرانوزیل جایگزین شده اند (Pereira et al., 2010).

تیلیاکورا تریاندارا^۴ یک سبزی مورد استفاده در شامل شرق تایلند و لائوس است که ترکیبات شیمیایی برگ های این گیاه توسط سینگتونگ^۵ و همکاران در سال ۲۰۰۹ مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج بهینه صمغ گیاه تیلیاکورا تریاندارا توسط آب با دمای 85°C به مدت ۱۰۰ دقیقه انجام گرفت. آنالیز FTIR نشان داد این صمغ به طور عمده از زایلوز تشکیل شده است و بسیار شبیه به زایلان می باشد. رفتار جریان صمغ مذکور رقیق شونده با برش بود که به مقدار غلظت وابستگی داشت (Singthong et al., 2009).

¹ *Agaricus brasiliensis*

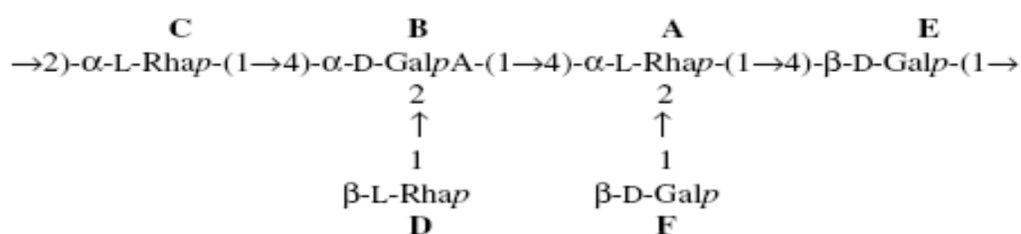
² *Heterodermia obscurata*

³ Pereira

⁴ *Tiliacora triandra*

⁵ Singthong

در سال ۲۰۰۸ هتروپلی ساکارید جدا شده از صمغ کتیرا^۱ توسط اوجا^۲ و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات تشکیل دهنده این صمغ شامل د- گالاکتوز، اسید د- گالاکتورونیک، و ال-رامنوز با نسبت های مولی ۲: ۱: ۳ بود. شکل ساختاری پلی ساکارید مذکور توسط آزمایش های هیدرولیز اسیدی، آنالیز متیلاسیون، اکسیداسیون پریودات، تجزیه اسمیت و NMR بررسی و واحدهای پلی ساکاریدی به صورت زیر شناسایی شدند (Ojha et al., 2008).



شکل ۱-۲: شکل ساختاری کتیرا (Ojha et al., 2008)

در سال ۲۰۰۷ امین و همکاران با انجام آزمایشات روی دانه گیاه دوراین^۳ یا خارگیل موفق به استخراج نوعی صمغ شدند. جداسازی و چربی زدایی توسط اتر پترولیوم و اتانول صورت گرفت و برای فرایند استخراج از محلول یک درصد اسید استیک استفاده شد. در نهایت خالص سازی آن توسط کمپلکس شدن این صمغ با هیدروکسید باریم انجام گرفت. بازده تولیدی آن حدود ۰/۵٪ بود که بعد از خشک کردن انجمادی بدست آمد. آنالیز قند بوسیله کروماتوگرافی کاغذی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حضور قندهای ال-رامنوز، گلوکز، د-گالاکتوز به نسبت های ۳: ۹: ۱ را نشان داد و همچنین مشخص شد که صمغ مذکور یک گالاکتومانان نیست (Amin et al., 2007).

در سال ۲۰۰۷ ویرا^۴ و همکاران موفق به جداسازی پلی ساکارید گالاکتومانان از صمغ دانه کهور پاکستانی^۵ شدند که در اندوسپرم دانه جمع شده است. جداسازی اندوسپرم دانه به وسیله تیمار

¹ *Cochlospermum religiosum*

² Ojha

³ *Durian*

⁴ Vieira

⁵ *Prosopis juliflora*

در آب 100°C به مدت ۲۰ دقیقه و نگهداشتن در دمای 4°C به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفت. سپس پلی ساکارید درون دانه توسط آب داغ با دمای 85°C استخراج شد. نتایج اسپکتروسکوپی NMR کربن ۱۳ و هیدروژن ۱ نشان داد که این صمغ از مانوز و گالاکتوز به نسبت ۱/۱:۱ تشکیل شده است (Vieira et al., 2007).

اسمیدرل^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۶ دو نوع پلی ساکارید از قارچ خوراکی فلامولینا ولوتیپز^۲ بوسیله آب داغ و محلول هیدروکسید پتاسیم ۲٪ و ۲۵٪ در دمای 100°C جداسازی کردند. تشخیص پلی ساکاریدهای مذکور توسط آنالیز متیلاسیون، NMR تک بعدی و دو بعدی، GC-MS و تجزیه اسمیت صورت گرفت. ساختار پلی ساکاریدهای استخراج شده توسط KOH ۲٪ دارای زنجیر اصلی از گلوکوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۳ و زنجیرهای جانبی از بتا گلوکان که در موقعیت اکسیژن شماره ۶ جایگزین شده اند تشکیل شده بود و پلی ساکاریدهای استخراج شده با KOH ۲۵٪ شامل زایلوز، مانوز، و گلوکز بودند (Smiderle et al., 2006).

در سال ۲۰۰۱ چوبی^۳ و همکاران با تحقیق و پژوهش روی دانه گیاهی به نام کاسیا آنگاستیفولیا^۴ که در کشور هند رشد می کند، دریافتند که این گیاه حاوی گالاکتومانان هایی متشکل از مانوز و گالاکتوز و وزن مولکولی حدود $10^4 \times 9/66$ می باشد. آنالیز متیلاسیون، اکسیداسیون پریودات، تجزیه اسمیت و NMR کربن ۱۳ نشان داد که ساختار این صمغ از گالاکتومانان با زنجیر اصلی از واحدهای بتا - د - مانو پیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۴ تشکیل شده است که تنها به واحدهای آلفا - د - گالاکتوپیرانوزیل با اتصالات ۱ به ۶ متصل شده اند (Chaubey et al., 2001).

کلاسن^۵ و همکاران در سال ۱۹۹۸ با بررسی روی گل های گیاه مالوا سیلوستریس^۶ دریافتند که

¹ Smiderle

² *Flammulina velutipes*

³ Chaubey

⁴ *Cassia angustifolia*

⁵ Classen

⁶ *Malva sylvestris*

موسیلاژ گل های این گیاه از پلی ساکاریدهای اسیدی با وزن مولکولی بالا در حدود $1/3$ الی $1/6 \times 10^6$ دالتون تشکیل شده اند. مطالعات نشان داد که پلی ساکارید مذکور از اسید گلوکورونیک و اسید گالاکتورونیک، رامنوز و گالاکتوز تشکیل شده است (Classen et al., 1998).

یک آرابینوگالاکتان محلول در آب حاوی د - گالاکتوز و ال - آرابینوز با نسبت مولی ۱: ۱/۴ از گل های مالوا موریتیان^۱ توسط کاپک^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۵ جدا سازی شد. هیدرولیز جزئی اسیدی، آنالیز متیلاسیون، اکسیداسیون پیرووات و اسپکتروسکوپی C^{13} - NMR شکل ساختاری این پلی ساکارید را مشخص کرد. نتایج نشان داد که ساختار آرابینوگالاکتان بسیار منشعب است و هسته اصلی آن شامل پیوندهای بتا - د - گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۶ می باشد که در ۶۵٪ از آنها در موقعیت کربن شماره ۳ زنجیرهای جانبی شامل باقیمانده های آلفا - ال - آرابینوفورانوزیل منشعب شده است (Capek et al., 1995).

۲-۳ استخراج و شناسایی پلی ساکاریدهای محلول در آب گونه های مختلف

مریم گلی

بر اساس مطالعات و بررسی های انجام شده تا کنون تحقیقی روی پلی ساکاریدهای گیاه مریم گلی ارغوانی انجام نشده است و تحقیقات انجام شده روی سایر گونه های مریم گلی محدود است که در زیر به شرح آن ها پرداخته شده است.

رضوی و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی و آنالیز FTIR روی صمغ دانه گیاه مریم گلی لوله ای^۳ نشان دادند که ساختار پلی ساکاریدی آن از واحدهای گالاکتومانان حاوی گالاکتوز و مانوز با نسبت های مولی $1/78 - 1/93$: ۱ تشکیل شده است که دارای وزن مولکولی متوسط $10^5 \times 4$ دالتون هستند (Razavi et al., 2014).

¹ *Malva mauritiana*

² Capek

³ *Salvia mocsosiphon*

کاپک^۱ در سال ۲۰۰۹ موفق به جداسازی گلوکومانان محلول در آب از پلی ساکاریدهای اندام هوایی مریم گلی معمولی^۲ شد. چربی زدایی با استفاده از متانول و کلروفرم به نسبت حجمی ۱۰ به ۱ انجام گرفت و فرایند استخراج با آب در دمای آزمایشگاه و در حضور ۰.۲٪ نیتروز آمید انجام شد. در نهایت با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی و ترسیب توسط معرف فهلینگ مشخص شد که این پلی ساکارید ترکیبی از د-گلوکز و د-مانوز به نسبت ۱/۰ به ۱/۳ و وزن مولکولی ۸۰۰۰ دالتون است. همچنین آنالیز اسپکتروسکوپی و شیمیایی نشان داد ساختار خطی پلیمری با زنجیر اصلی از واحدهای ۱ و ۴-بتا گلوکوپیرانوزیل و مانوپیرانوزیل و زنجیرهای جانبی منشعب شده در کربن شماره ۶ است که عمدتاً از واحدهای گلوکوزیل و مانوزیل در انتها، تشکیل شده است (Capek, 2009).

کاپک در سال ۲۰۰۸ با تحقیق روی اندام های هوایی مریم گلی معمولی موفق به شناسایی پلی ساکاریدهای محلول در آب این گیاه شد. استخراج توسط آب در دمای آزمایشگاه در حضور ۰.۲٪ سدیم آزید انجام گرفت و بر اساس آنالیزهای مختلف مانند کروماتوگرافی تبادل یونی، متیلاسیون، هیدرولیز اسیدی جزئی، FT-IR و NMR مشخص شد که پلی ساکارید مذکور از گالاکتوز ۱۷/۹٪، ۳-O - متیل گالاکتوز ۳٪، گلوکز ۱۵/۵٪، مانوز ۸/۳٪، آرابینوز ۳۰/۴٪، زایلوز ۷/۶٪، فوکوز ۲/۶٪، رامنوز ۶/۷٪ و اسید اورونیک ۰/۸٪ تشکیل شده است (Capek, 2008).

وانگ^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۶ موفق به جداسازی دو نوع پلی ساکارید از ریشه های مریم گلی میلیتوریهز^۴ شدند. استخراج در آب گرم صورت گرفت و برای ترسیب از الکل استفاده شد. پلی ساکاریدهای خام بدست آمده بوسیله رزین تبادل یون و ستون جریان سریع سفاروز DEAE خالص سازی شد. پس از رنگ زدایی با پراکسید هیدروژن و دیالیز، دو پودر زرد روشن از طریق خشک کن انجمادی بدست آمد. آنالیز بوسیله ¹³C NMR و طیف سنجی IR نشان داد که ساختار پلی ساکارید

¹ Capek

² *Salvia officinalis*

³ Wang

⁴ *Salvia miltiorrhiza*

اول از آلفا-د- گلوکز با اتصالات ۱ به ۶ و مقدار کمی آلفا-د- گلوکز با اتصالات ۱ به ۲ و ساختار پلی ساکارید دوم از آلفا-د- گلوکز با اتصالات ۱ به ۶ تشکیل شده است (Wang et al., 2006).

کاپک در سال ۲۰۰۴ موفق به جداسازی یک آرابینوگالاکتان شامل ۳-O - متیل-د- گالاکتوز از اندام های هوایی مریم گلی معمولی شد. پلی ساکارید توسط آب در دمای آزمایشگاه استخراج شد. با استفاده از کروماتوگرافی ژلی، متیلاسیون، هیدرولیز اسیدی جزئی و NMR مشخص شد که ساختار این ترکیب شامل زنجیر اصلی از بتا-د- گالاکتوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۶ می باشد که در یک سوم انتهای زنجیر واحدهایی از د-گالاکتوپیرانوزیل همراه با گروه های متوکسیل و در یک سوم دیگر زنجیر واحدهایی از ال - آرابینوز منشعب شده اند (Capek, 2004).

لین^۱ و همکاران در سال ۱۹۹۴ با بررسی و آزمایش روی دانه صمغی مریم گلی چیا یا سالویا هیسپانیکا^۲ نشان دادند که صمغ گیاه مذکور از پلی ساکاریدهای بتا - د - زایلوز، آلفا - د - گلوکز و (اسید ۴ - O - متیل - آلفا - د - گلوکورونیک) به ترتیب با نسبت های مولی ۲: ۱: ۱ تشکیل شده است. استخراج توسط آب در دمای آزمایشگاه صورت گرفت. وزن مولکولی آن توسط فیلتراسیون ژلی در حدود $10^6 \times 2$ دالتون تعیین شد. این محققین در نتیجه هیدرولیز جزئی یک اسید آلدیورونیک و ۲ - O - (اسید ۴ - متیل - آلفا - د - گلوکوپیرانوزیدورونیک) - د - زایلوز بدست آوردند (Lin et al., 1994).

¹ Lin

² *Salvia hispanica*

فصل سوم:

مواد و روش ها

۳ مواد و روش ها

۳-۱ مواد اولیه و محلول های شیمیایی

۳-۱-۱ جمع آوری ریشه های مریم گلی ارغوانی

گیاه مریم گلی ارغوانی توسط گیاه شناس معروف دکتر ولی ا...مظفریان، شناسایی شد. ریشه های این گیاه در فصل بهار، در طی ماه های اردیبهشت و خرداد از منطقه ای نزدیک به هفتاد قله اراک واقع در استان مرکزی جمع آوری شدند و بعد از شستن و خشک کردن، ریشه ها در بسته های نایلونی به آزمایشگاه منتقل شدند. ریشه ها به اندازه مطلوب حدود ۱ سانتی متر خرد شده و مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱: نمایی از ریشه های مریم گلی ارغوانی

۳-۱-۲ مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده

مونوساکاربدهای استاندارد خالص (د - مانوز، ال - رامنوز، د - گلوکز، د - گالاکتوز، ال - آرابینوز، د - زایلوز و اسید ال - گالاکتورونیک) و حلال هایی نظیر ^۱ DMSO و ^۲ DSS از شرکت های سیگما^۳

^۱ Dimethyl sulfoxide

^۲ 4,4- Dimethyl-4-silapentan-1-sulfanic acid

^۳ Sigma

(آمریکا) و مرک^۱ (آلمان) و استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی متفاوت (۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون) از شرکت فارماسیا^۲ (اُپسلا^۳، سوئد) تهیه شدند.

اسید تری فلورواستیک به کار گرفته شده برای انجام آزمون های شیمیایی از شرکت فلوکا^۴ DEAE - سلولز و سفاکریل^۵ S - ۴۰۰ مورد نیاز برای خالص سازی پلی ساکارید مورد نظر نیز از شرکت فارماسیا (اُپسیلا، سوئد) خریداری شدند.

۲-۳ دستگاه های مورد استفاده

دستگاههای مورد استفاده در طی مراحل استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدهای محلول در آب موجود در نمونه، شامل موارد زیر بود:

ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم ساخت شرکت ای اند دی^۶ ژاپن، تبخیر کننده دورانی همراه با پمپ های خلاء مخصوص، ساخت شرکت هیدلف^۷ آلمان و سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ rpm و قابل استفاده در مقیاس حجمی بالا (۱ لیتری) ساخت شرکت ایندورف^۸ آلمان. دستگاه خشک کن انجمادی ساخت شرکت مارتین کریست^۹ آلمان (مدل Alpha 1-2)، کروماتوگرافی غربال مولکولی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو^{۱۰}) همراه با ستون ژل - تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال^{۱۱} ساخت توسو^{۱۲} ژاپن، دستگاه پلاریمتر پرکین الِمِر^{۱۳} ۳۴۳ ساخت کشور آمریکا،

¹ Merck

² Pharmacia

³ Uppsala

⁴ Feluka

⁵ Sephacryl

⁶ A&D

⁷ Heidolph

⁸ Eppendorf

⁹ Martin Christ

¹⁰ Shimadzu

¹¹ TSK-GEL G3000PWXL

¹² Tosoh

¹³ Perkin-Elmer 343

اسپکتروفتومتر واریان کری ۱۰۰ - بیو^۱ ساخت کشور آمریکا، طیف سنج مادون قرمز نیکولت ۵۷۰۰
ساخت کشور آمریکا، کروماتوگرافی گازی واریان ۳۴۰۰^۳ ساخت کشور آمریکا، طیف سنج رزونانس
مغناطیس هسته ای مدل بروکر آوی - ۵۰۰^۴ ساخت کشور آلمان و کروماتوگرافی - طیف سنج
جرمی مدل اچ پی ۵۸۹۰^۵ ساخت کشور آمریکا، طی مراحل آنالیز شیمیایی و دستگاهی جهت
شناسایی و تشخیص ساختار شیمیایی و مولکولی پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار گرفتند.

از دیگر وسایل و دستگاه های مورد استفاده در این پژوهش می توان به انواع ستون های
کروماتوگرافی، کیسه دیالیز با ۳/۵ cut off کیلو دالتون، قیف های بوختر، سینتر گلاس، همزن های
مغناطیسی مجهز به سیستم حرارتی، سونیکاتور (آلتراسونیک)، بن ماری (حمام آب گرم) و دکانتورها
اشاره کرد.

۳-۳ روش کار

۳-۳-۱ حذف رنگ، چربی، ساپونین و ریز مولکول ها

۱۰۰ گرم از ریشه های مریم گلی ارغوانی را در بالن ۵۰۰۰ میلی لیتر به مدت ۳ الی ۴ ساعت در ۱/۵
لیتر الکل ۹۶٪ به صورت آرام جوشانده شد. این فرایند سه مرتبه تکرار شد و رنگ، ساپونین ها و
مونوساکاریدها حذف شدند. سپس نمونه ها در زیر هود خشک و جمع آوری شد.

¹ Varian Cary100-Bio

² Nicolet 5700

³ Varian 3400

⁴ Bruker AV-500

⁵ HP 5890

۲-۳-۳ استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب

۱-۲-۳-۳ استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از نمونه

۵۰ گرم از قطعات خرد شده ریشه گیاه مریم گلی ارغوانی که قبلاً رنگ بری شده بود با استفاده از یک لیتر آب مقطر 70°C به مدت ۴ ساعت استخراج شد. این فرایند سه مرتبه تکرار شد و بخش نامحلول پلی ساکارید توسط سانتریفیوژ جدا و صاف شد. در نهایت حجم محلول صاف شده توسط تبخیر کننده دورانی تحت خلا در دمای 70°C کاهش یافت و مقدار حجم آن به یک سوم مقدار اولیه کاهش یافت.

۲-۲-۳-۳ جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب

۱-۲-۲-۳-۳ ترسیب پروتئین ها

جداسازی پلی ساکاریدهای مورد نظر از سایر ترکیبات در نمونه، برای شناسایی ساختار شیمیایی و مولکولی پلیمر، فرایند مهم و ضروریست که یکی از این ترکیبات پروتئین ها هستند. در این مرحله پروتئین ها به روش سواگ از عصاره آبی حاصل از مرحله استخراج، جداسازی شد (Stuab, 1965).

در روش پروتئین زدایی سواگ ۲۰٪ حجم عصاره آبی کلروفورم اضافه شد و میزان ۱- بوتانول نیز ۲۰٪ حجم کلروفورم مصرفی بود. مخلوط به مدت نیم ساعت توسط همزن مغناطیسی همزده شد و پس از واسرشت شدن پروتئین های موجود در امولسیون، فرایند سانتریفیوژ کردن با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت. در پایان کار مواد ناخالص پروتئینی به صورت یک لایه ژل مانند در حد واسط لایه های کلروفورم و عصاره آبی قرار گرفت و به شکل سه فاز متمایز از یکدیگر در آمد. در نهایت عصاره آبی پروتئین زدایی شده حاوی پلی ساکارید از بخش فوقانی جدا شد (Zhu et & Staub, 1965).

(al., 2011).

۳-۲-۲-۳-۲ ترسیب پلی ساکاریدهای محلول در آب

برای ترسیب پلی ساکاریدهای محلول، به عصاره آبی پروتئین زدایی شده اتانول ۹۶ درجه به میزان ۳/۵ برابر حجم عصاره اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C (دمای یخچال) قرار گرفت. سپس رسوبات موجود در محلول حاوی اتانول توسط سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه جداسازی شد. در نهایت پلی ساکاریدهای ترسیب شده در دیواره لوله های شیشه ای توسط آب گرم 60°C شسته شد و توسط دستگاه خشک کن انجمادی به مدت ۲ روز خشک شد (جهان بین، ۱۳۹۰).

۳-۳-۳ خالص سازی پلی ساکاریدهای محلول در آب

از آنجایی که کمترین مقدار ناخالصی در نمونه مورد نظر تشخیص ساختار پلی ساکاریدها را دچار مشکل می کند لذا انجام دقیق مرحله خلوص سازی بسیار مهم می باشد و یکنواختی و درجه خلوص نمونه قبل از آنالیز طیف سنجی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است.

یکی از حساس ترین و بهترین روش های مورد استفاده برای خالص سازی و حذف سایر آلودگی های غیر کربوهیدراتی، بهره بردن از انواع مختلف روش های کروماتوگرافی است. برای جداسازی پلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی، کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ستون حاوی DEAE - سلولز بسیار مناسب است. در این روش ابتدا پلی ساکارید خام حاصل از مرحله استخراج، توسط حجم کمی آب یون زدایی با درجه حرارت 60°C به صورت محلول درآمد و به ستون کروماتوگرافی حاوی فاز ثابت DEAE - سلولز (۲/۶ سانتیمتر \times ۳۰ سانتیمتر) منتقل شد. لازم به ذکر است که بطور معمول برای خالص سازی هر ۸ گرم پلی ساکارید، حدود ۲۰۰ گرم DEAE - سلولز کفایت می کند.

بلافاصله بعد از وارد کردن پلی ساکاریدها به داخل ستون، ستون توسط آب و بعد از آن محلول آبی کلرید سدیم با گرادیان غلظتی بین صفر تا یک مولار شسته شد و کنترل فرایند توسط روش فنل -

اسید سولفوریک انجام گرفت (Zhu et al., 2016).

در این روش ۵ سی سی اسید سولفوریک غلیظ و ۱ سی سی فنل به ۱ سی سی از محلول های خارج شده از ستون (فراکشن ها) در دوره های زمانی معین اضافه شد و سپس نمونه ها پس از گذشت ۱۰ دقیقه استراحت به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب 30°C قرار گرفتند. حضور فنل به عنوان معرف باعث تغییر رنگ کمپلکس حاصل از تجزیه قند توسط اسید سولفوریک غلیظ می شود. این رنگ زرد تا نارنجی متمایل به قهوه ای می باشد و شدت رنگ ایجاد شده نشان دهنده غلظت قند موجود در فرکشن است که این غلظت قند توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر قابل اندازه گیری است. فرکشن های خروجی از ستون جمع آوری و در دستگاه تبخیرکننده دورانی تغلیظ شده و به فریزر منتقل شد و در نهایت بعد از انجماد کامل، نمونه توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک شد (Whistler, 1965).

تعیین همگنی پلی ساکارید محلول در آب توسط روش کروماتوگرافی ستونی حاوی فاز ثابت سفاکریل S-400 ابعاد ستون (۷۰ cm × ۱/۶ cm) صورت گرفت. شستشوی ستون توسط آب یون زدایی شده و با سرعت جریان حجمی ۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد (جهان بین، ۱۳۹۰). فرکشن های جمع آوری شده تغلیظ و توسط خشک کن انجمادی خشک شدند.

۳-۳-۴ شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای خالص

روش های مورد استفاده برای شناسایی و آنالیز پلی ساکاریدها متفاوت از سایر روش های شناسایی ساختار دیگر پلیمرهاست و به تجهیزات و تکنیک های پیشرفته ای نیازمند است. برای به دست آوردن ساختار پلی ساکاریدها، روش های شیمیایی و دستگاهی گوناگونی استفاده می شود. در ادامه تکنیک هایی که برای شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای موجود در ریشه گیاه مریم گلی ارغوانی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت به تفصیل بیان شده است.

۳-۳-۴-۱ تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص

همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب موجود در نمونه با استفاده از روش های کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی روی ستون سفاکریل S-۴۰۰ و کروماتوگرافی ژل تراوا توسط سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو) همراه با ستون ژل - تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال ساخت توسو ژاپن ($7/8 \times 300$ میلی متر) مورد بررسی قرار گرفت. طی این روش از محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم با سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه برای شستشوی ستون استفاده شد و آشکار ساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست نور مدل RID-10A (شیمادزو) ژاپن بود. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی مشخص (۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۷۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰۰ دالتون) حاصل شد. دمای ستون در طول آزمایش در 40°C تنظیم شد و در نهایت وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از منحنی کالیبراسیون ذکر شده در قسمت فوق محاسبه گردید (Sun et al., 2010 & Jahanbin et al., 2011).

۳-۳-۴-۲ طیف سنج مادون قرمز

جهت تعیین طیف مادون قرمز پلی ساکارید محلول در آب نمونه و تعیین گروه های عاملی موجود در آن، از طیف سنج مادون قرمز مدل نیکولت ۵۷۰۰ (مدسیون، آمریکا) استفاده شد. در این مرحله پلی ساکارید کاملاً خالص (۱-۲ میلی گرم) پس از اختلاط با پودر برومور پتاسیم (درجه خلوص اسپکتروسکوپی) فشرده شد و به صورت قرص ۱ میلی متری مناسب برای آنالیز توسط دستگاه طیف سنج مادون قرمز درآمد. در نهایت نمودار تغییرات درصد نور عبور داده شده بر حسب فرکانس در محدوده 4000 تا 400 cm^{-1} رسم شد (Zhu et al., 2016).

۳-۳-۴-۳ تعیین درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید محلول در آب نمونه با استفاده از دستگاه پلاریومتر پرکین المر ۳۴۳ (ساخت کشور آمریکا) تعیین شد. برای این منظور ابتدا ۱۰۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در حمام آب جوش به مدت ۳ ساعت تحت فرایند هیدرولیز قرار گرفت. در ادامه ۵ میلی گرم از پلی ساکارید هیدرولیز شده پس از به حجم رساندن در یک بالن ژوژه ۵ میلی لیتری به لوله ۲ دسی متری دستگاه منتقل شد. اندازه گیری در دمای 20°C و طول موج ۵۸۹ نانومتر انجام گرفت و در نهایت درجه چرخش نوری پلی ساکارید محلول در آب نمونه مورد نظر با قرار گرفتن عدد خوانده شده از دستگاه در رابطه زیر محاسبه گردید (Chaplin et al., 1994).

$$\alpha = \frac{\alpha'}{L \times C}$$

که در آن L طول لوله بر حسب دسی متر، C غلظت بر حسب گرم بر میلی لیتر، α' عدد خوانده شده از دستگاه و α درجه چرخش نوری پلی ساکارید نمونه است.

۳-۳-۴-۳ جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش

از آنجایی که عدم جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش نشان دهنده عدم حضور ناخالصی های پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید و در نتیجه عملکرد مناسب مرحله خالص سازی است، بنابراین جهت اطمینان از عدم حضور پروتئین ها و خلوص بالای پلی ساکاریدها می توان از طیف فرابنفش استفاده کرد. در این روش پس از تهیه محلولی از پلی ساکارید خالص شده (غلظت مهم نیست) و انتقال آن به سلولی از جنس کوارتز، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر واریان کری

۱۰۰- بیو (ساخت کشور آمریکا) جذب محلول حاوی نمونه مورد نظر در ناحیه ۲۸۰ نانومتر ثبت شد (Shabani et al., 2016).

۳-۳-۴-۵ تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید

روش فنل - اسید سولفوریک در طول موج ۴۹۰ نانومتر برای تعیین قند کل انجام گرفت و د - گلوکز به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد (Dubois et al., 1956). بعلاوه به منظور تعیین کمی و کیفی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید از کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳۴۰۰ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. ستون بکار گرفته شده در این روش از نوع موئینه مدل دی ام^۱ - ۲۳۳۰ (۳۰ متر × ۰/۳۲ میلی متر × ۰/۲ میکرومتر) و آشکار ساز مورد استفاده از نوع یونش شعله ای بود (جهان بین و بیگی، ۱۳۹۶).

شرایط تنظیم درجه حرارت ستون به این نحو بود که در ابتدا دمای ستون در ۱۲۰°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند، سپس تا دمای ۲۵۰°C (با نرخ ۸°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در همین دما نگهداری شد. بعلاوه دمای قسمت تزریق و آشکار ساز به ترتیب ۲۵۰°C و ۳۰۰°C در نظر گرفته شد. از گاز نیتروژن به عنوان گاز متحرک حامل (فاز متحرک) با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی متر بر دقیقه استفاده گردید.

نمونه قبل از تزریق به دستگاه باید طی مراحل معینی آماده سازی و سپس به دستگاه منتقل شود. روش آماده سازی نمونه به این صورت بود که ابتدا ۱۵ میلی گرم پلی ساکارید در داخل لوله آزمایش توزین شد و ۲ میلی لیتر محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک به آن اضافه گردید. در ادامه لوله های آزمایش به صورت درب بسته در دمای ۱۲۰°C به مدت ۲ ساعت در معرض حرارت قرار گرفت. سپس اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب ۴۰°C حذف شد و در نهایت با مصرف ۵۰

¹ DM-2330

میلی گرم بروهیدرید سدیم نمونه هیدرولیز شده خنثی گردید. اسیدی کردن نمونه ها با استفاده از اسید استیک انجام گرفت و اسید بوریک اضافی با استفاده از متانول حذف شد و آلدیتول های حاصل توسط مخلوط پیریدین - انیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام C ۹۰° به مدت ۱ ساعت استیله و به استات های آلدیتول تبدیل شدند. استات های آلدیتول مونوساکاریدهای استاندارد (د - گلوکز، د - گالاکتوز، ال - رامنوز، د - مانوز، ال - آرابینوز، د - زایلوز و اسید ال - گالاکتورونیک) همراه با ۲ میلی گرم میو - اینوزیتول (به عنوان استانداردهای داخلی) همانند روش ذکر شده در بالا تهیه و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شدند.

مقدار اسید اورونیک با اندازه گیری میزان جذب در ۵۲۵ نانومتر توسط روش رنگ سنجی - m hydroxydiphenyl و استفاده از استاندارد اسید D- گلوکورونیک انجام شد (filisetti - cozz et al., 1991). روش کار به این صورت بود که به ۰/۴ میلی لیتر محلول پلی ساکارید خالص در آب ۲/۴ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد. سپس لوله های آزمایش با درب بسته در حمام آب جوش (دمای C ۱۰۰°) به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شدند. پس از این که لوله های آزمایش در یک حمام یخ سرد شد ۱۵۰ میکرولیتر معرف متا - هیدروکسی دی فنیل به آن ها اضافه شد و لوله های آزمایش در دمای محیط برای ۱۵ دقیقه تا یک ساعت قبل از اندازه گیری میزان جذب انکوبه شدند و در نهایت جذب محلول حاوی پلی ساکارید خالص و محلول شاهد (اسید گلوکورونیک) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر واریان کری ۱۰۰ - بیو (ساخت کشور آمریکا) در ناحیه ۵۲۵ نانومتر ثبت شد.

به منظور تعیین نوع و مقدار اسیدهای اورونیک در ساختار پلی ساکارید، پلی ساکارید خالص توسط NaBH₄ احیاء و تمام گروه های COOH اسید اورونیک آن با -CH₂OH جایگزین شد، پلی ساکارید حاصل تحت عنوان پلی ساکارید احیاء شده در آزمون تعیین واحدهای مونومری سازنده مشابه با پلی ساکارید خالص اولیه توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد (Shabani et al., 2016).

۳-۳-۴-۶ هیدرولیز اسیدی ملایم

از روش تانگ و همکاران (۲۰۰۸) برای انجام هیدرولیز اسیدی ملایم پلی ساکارید محلول در آب استفاده شد. در این روش ابتدا ۸۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۳ میلی لیتر از محلول ۰/۰۵ مولار اسید تری فلورواستیک در دمای 80°C به مدت ۱۶ ساعت تحت فرایند هیدرولیز قرار گرفت. رسوبات حاصل از فرایند سانتریفیوژ کردن پلی ساکارید هیدرولیز شده تحت عنوان پلی ساکارید ۱ نامگذاری شدند. در ادامه سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت تحت فرایند دیالیز قرار گرفت و در نهایت فراکشن جدا شده، جمع آوری و تحت عنوان پلی ساکارید ۴ نامگذاری شد. سیال باقیمانده در کیسه دیالیز با اتانول رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عنوان پلی ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند. تمامی فراکشن ها پس از خشک شدن، توسط دستگاه کروماتوگرافی مطابق با روشی که قبلا اشاره شد مورد آنالیز قرار گرفتند (Tong et al., 2008 & Ghasemlo et al., 2012).

۳-۳-۴-۷ اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت

ابتدا ۲۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۴ مولار پرپودات پتاسیم اکسید شد و پس از نگهداری در تاریکی، میزان جذب آن در ۲۳۳ نانومتر هر ۴ ساعت یکبار ثبت گردید. بعد از ۹۶ ساعت هنگامی که میزان جذب ثابت شد و فرایند اکسیداسیون به پایان رسید، پرپودات سدیم مازاد از طریق افزودن اتیلن گلیکول حذف شد. مصرف پرپودات و تولید اسید فرمیک به ترتیب با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و تیتراسیون با محلول ۰/۰۵۳ مولار سود تعیین شد (Gong et al., 2016).

محلول حاوی محصولات حاصل از عمل پرپودات پس از دیالیز به مدت ۴۸ ساعت، توسط ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم در دمای 25°C و به مدت ۱۲ ساعت خنثی شد. در نهایت فرایند هیدرولیز کامل با استفاده از محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک، مطابق با روشی که برای آنالیز

مونوساکاریدها اشاره شد، انجام گرفت و ترکیبات حاصل پس از استیله شدن توسط روش کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند (Ghasemlo et al., 2012).

۳-۳-۴-۸ متیلاسیون

برای انجام متیلاسیون ۵ میلی گرم پلی ساکارید کاملاً خشک به داخل بالن ۲۵ میلی لیتر منتقل و ۱ میلی لیتر DMSO با استفاده از سرنگ شیشه ای به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سونیکیت شد و مجدداً به آن (توسط سرنگ شیشه ای) ۰/۰۴ میلی لیتر محلول متیل سولفات سدیم اضافه شد. سپس ژل حاصل تحت فرایند سونیکیت شدن در دمای 25°C به مدت ۲۰ دقیقه به حالت مایع تبدیل شد. در ادامه پس از افزودن ۰/۳ میلی لیتر یدید متیل خشک، مجدداً در دمای 25°C به مدت ۱۵ دقیقه تحت فرایند سونیکیت قرار گرفت. مخلوط حاصل به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار کمی آب برای خنثی کردن متیل سولفینیل متیل سدیم^۱ مازاد، به آن اضافه گردید. پس از انتقال سوسپانسیون حاصل به لوله های سانتریفیوژی ۱۲ میلی لیتری، پلی ساکارید متیله شده موجود در سوسپانسیون توسط ۴ میلی لیتر کلروفرم استخراج شد و با استفاده از طیف سنج مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت. عدم پیک جذبی در نواحی مربوط به گروه هیدروکسیل (حدود 3420 cm^{-1}) بیانگر کامل شدن فرایند متیله کردن است.

محصولات متیله شده توسط اسید فرمیک و محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک هیدرولیز و پس از حذف اسید مازاد توسط بروهیدرید سدیم خنثی شدند. آلدیتول های حاصل توسط مخلوط پیریدن – انیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام آب 90°C به مدت ۱ ساعت استیله و به استات های آلدیتول مربوطه تبدیل شدند و در نهایت استات های آلدیتول پاره ای متیله شده توسط کروماتوگرافی گازی – طیف سنج جرمی مورد آنالیز قرار گرفتند.

¹ Methyl sulfinyl methyl sodium

کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی مورد استفاده مجهز به ستون موئینه کوارتزی HPS (۲۵) متر \times ۰/۲۲ میلی متر \times ۰/۲ میکرومتر) بود. دمای ستون در 120°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای 260°C (با نرخ 15°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در همین دما نگهداری شد. سایر مشخصات مشابه با کروماتوگرافی گازی بود که در قسمت قبل برای شناسایی مونوساکاریدها مورد استفاده قرار گرفت (Chalplin et al., 1994).

۳-۳-۴-۹ طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای

طیف های NMR پروتون و کربن - ۱۳ پلی ساکارید خالص توسط طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای در $500/13$ مگاهرتز برای NMR پروتون و $125/75$ مگاهرتز برای NMR کربن - ۱۳ در دمای 27°C ثبت شد. استاندارد مورد استفاده DSS و زمان بازداري ۲ ثانیه بود. مقداری از پلی ساکارید پس از این که در حلال بی اثر D_2O (۹۹/۹٪) به صورت محلول در آمد، در بین دو قطب مغناطیسی دستگاه قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده در آن بوسیله دستگاه NMR در مقایسه با جسم استاندارد به صورت پیک هایی با ارتفاع متفاوت ثبت و بررسی شد (Jahanbin et al., 2011). آزمون های NMR دو بعدی $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY^۱، $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC^۲ و $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC^۳ نیز بر روی پلی ساکارید خالص انجام گرفت.

^۱ Correlation Spectroscopy

^۲ Heteronuclear multiple - quantum coherence

^۳ Heteronuclear multiple - bond coherence

فصل چہارم

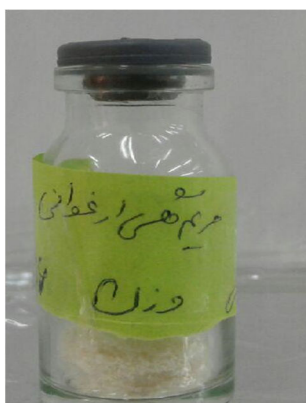
نتایج و بحث

۴ نتایج و بحث

۴-۱ استخراج، خالص سازی و شناسایی واحدهای سازنده پلی ساکارید

۴-۱-۱ استخراج و خالص سازی

راندمان استخراج پلی ساکارید ناخالص با آب گرم (۷۰°C)، ۰/۱۶٪ بر اساس وزن خشک ریشه مریم گلی ارغوانی بود. پس از خالص سازی پلی ساکارید خام با ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفاکریل S-۴۰۰، پلی ساکارید خالص ریشه مریم گلی ارغوانی بدست آمد. راندمان تولید پلی ساکارید خالص از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفاکریل S-۴۰۰ به ترتیب ۰/۴۷٪ و ۰/۲۵٪ بر اساس وزن ریشه های خشک اولیه بود که در مقایسه با راندمان پلی ساکارید خالص جدا شده از اندام های هوایی گیاه مریم گلی معمولی (۷/۵ - ۳/۵٪) کمتر بود (Capek, 2009 & Capek, 2004). این مقایسه نشان می دهد که میزان پلی ساکارید در قسمت های مختلف گیاه و گونه های آن متفاوت است و همچنین نوع خالص سازی در مقدار راندمان تأثیر گذار است. شکل ۴-۱ پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی را نشان می دهد.



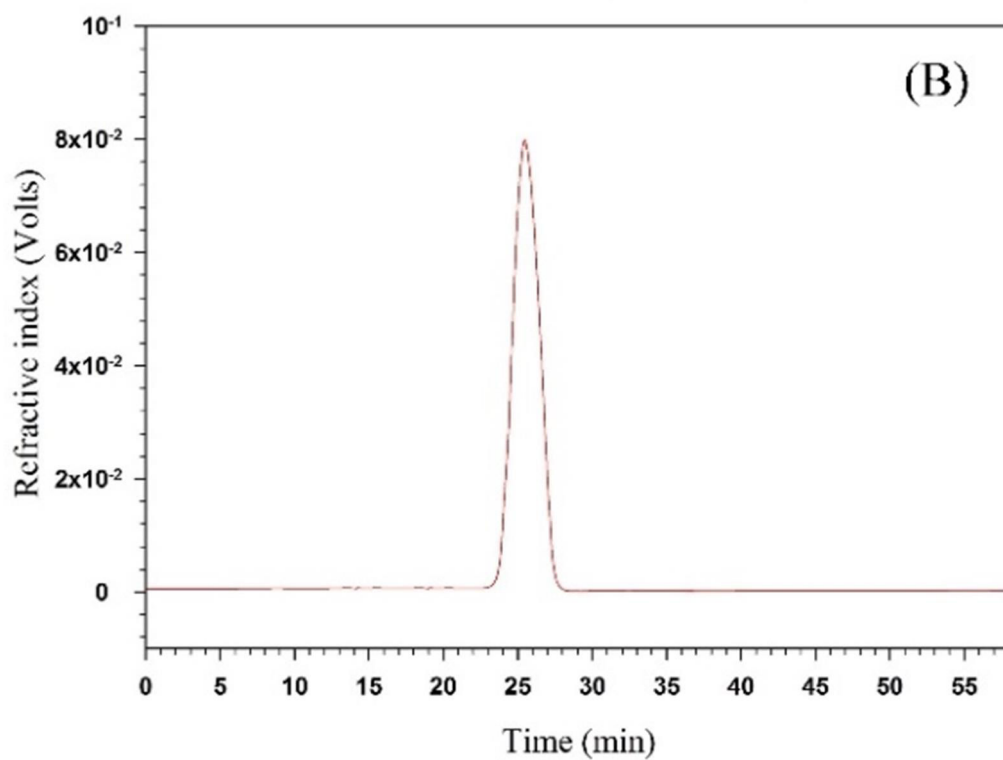
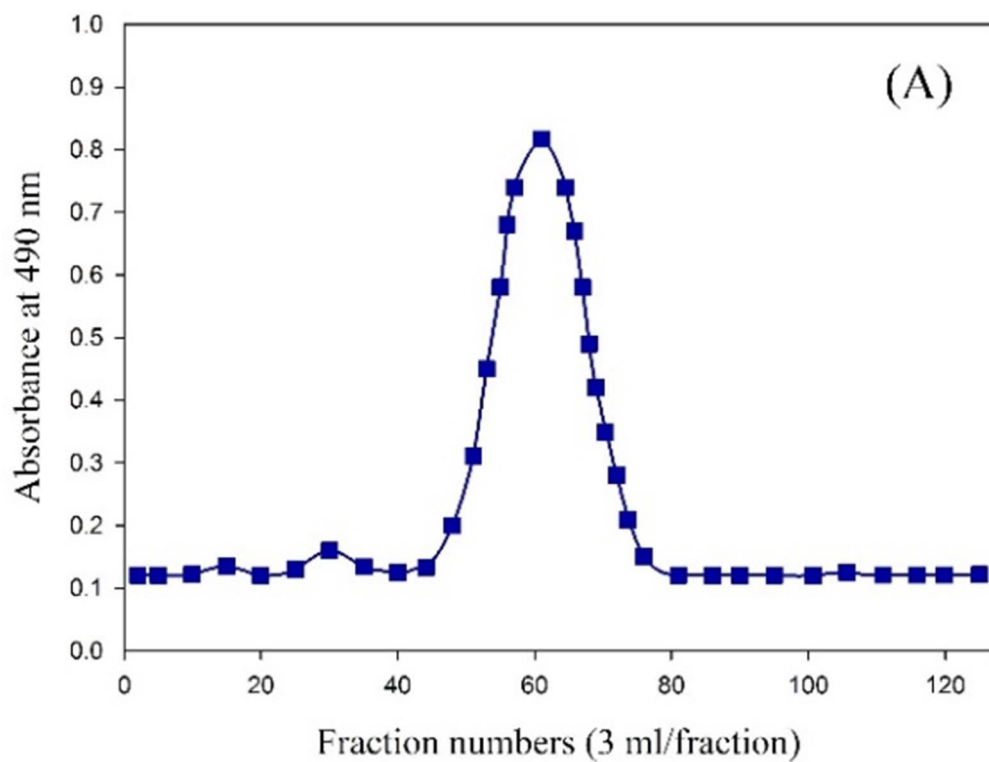
شکل ۴-۱: پلی ساکارید خالص ریشه مریم گلی ارغوانی.

پلی ساکارید خالص فاقد جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش بود که بیانگر عدم حضور

پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید خالص و انجام مناسب و کارآمد روش های خالص سازی استفاده شده در این تحقیق بود.

۴-۱-۲ تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص

همانطور که اشاره شد بمنظور تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص، از ستون های سفاکریل S-۴۰۰ و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا با استفاده از استانداردهای دکستران استفاده شد. منحنی پلی ساکارید خالص شسته شده از ستون کروماتوگرافی سفاکریل S-۴۰۰ دو پیک جزئی و یک پیک متقارن بزرگ را نشان داد (شکل ۴-۲ بخش A)، از اینرو فراکشن های شماره ۴۰ تا ۸۰ مربوط به پیک بزرگ متقارن ادغام و جهت تعیین وزن مولکولی بوسیله کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا (HPGPC) همراه با آشکار ساز ضریب شکست نور مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به شکل ۴-۲ بخش B مشاهده می شود که پلی ساکارید خالص، پیک منحصر به فرد و متقارنی دارد که نشان دهنده همگن بودن پلی ساکارید خالص است. با مقایسه منحنی های مربوط به پلی ساکارید خالص و استاندارد دکستران، میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی، ۹۵۸۰۰ دالتون (۹۵/۸ کیلو دالتون) محاسبه شد که بسیار کمتر از وزن مولکولی پلی ساکارید خالص نوع اول (۱۳۹۰ کیلو دالتون) و نوع دوم (۴۰۳ کیلو دالتون) حاصل از ریشه های گونه مریم گلی میلیتورھیزا بود (Wang et al., 2006). بعلاوه با تحقیقاتی که توسط کاپک روی پلی ساکارید اندام های هوایی مریم گلی معمولی انجام شد میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص این گیاه ۹۵-۲ کیلو دالتون بود که در مقایسه با وزن مولکولی پلی ساکارید خالص مریم گلی ارغوانی کمتر است (Capek, 2004).



شکل ۴-۲: منحنی فراقشن های شسته شده با ستون سفاکریل ۴۰۰ S- (A) و کروماتوگرام HPGPC (B).

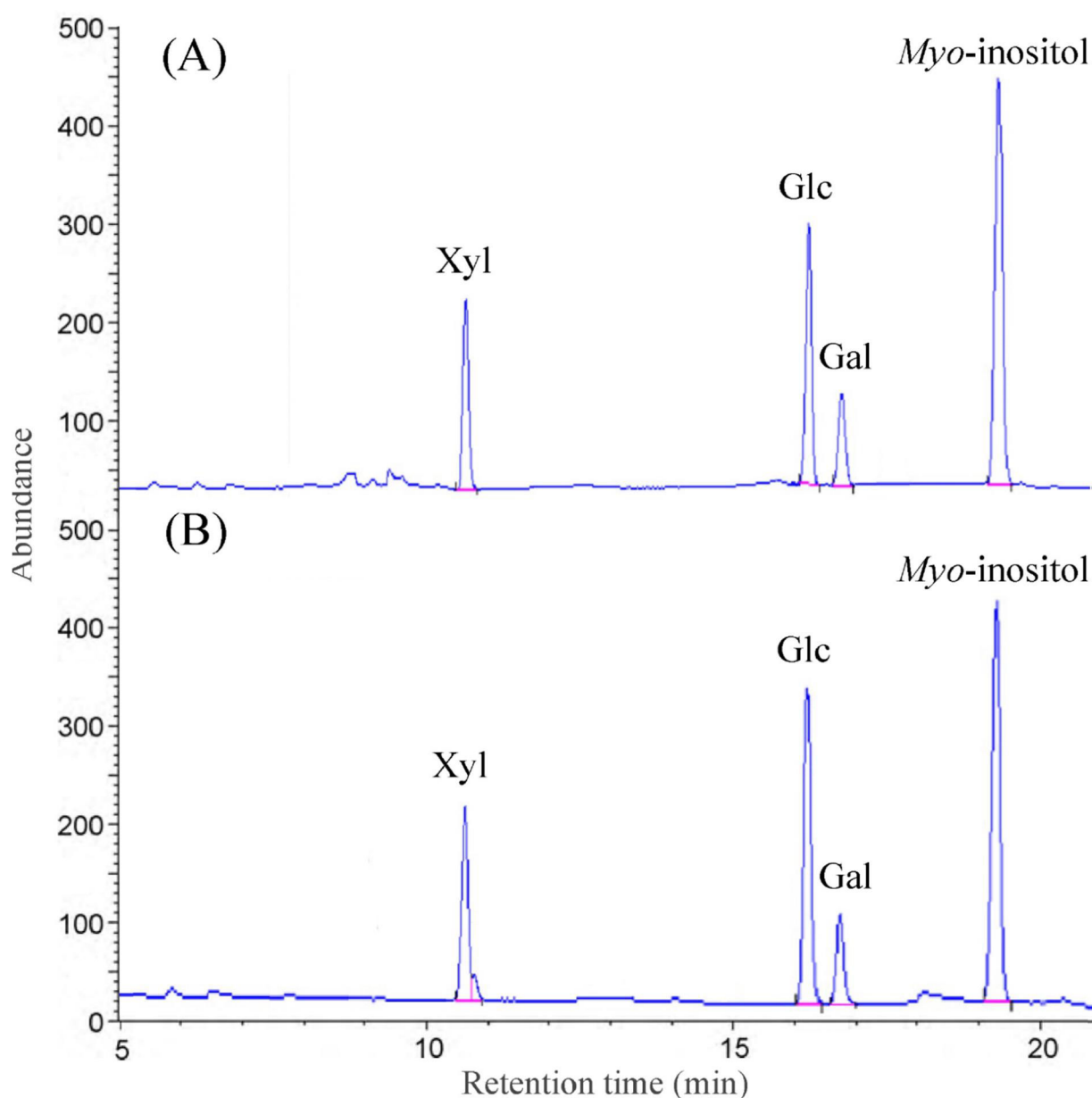
۲-۴ تعیین ساختار

۱-۲-۴ تعیین درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی $136/3^{\circ} +$ در دمای $20^{\circ}C$ و توسط دستگاه پلاریومتر محاسبه شد. با توجه به اینکه درجه چرخش نوری بالاتر از $100^{\circ} +$ بیانگر وجود سهم بیشتر اتصالات نوع آلفا (α) نسبت به بتا (β) در ساختار قندهاست لذا می توان نتیجه گرفت که واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده ساختار پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی، اکثراً از طریق اتصالات نوع آلفا به یکدیگر متصل شده اند، هر چند که ممکن است اتصالات نوع بتا نیز در ساختار پلی ساکارید وجود داشته باشند.

۲-۲-۴ تعیین قند کل و شناسایی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید خالص

میزان قند کل پلی ساکارید خالص پس از اندازه گیری با روش فنل - اسید سولفوریک، $98/9\%$ تعیین شد که بیانگر درجه خلوص بسیار بالای پلی ساکارید استخراج شده و انجام خوب مراحل خالص سازی بود. برای تعیین واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص، ابتدا پلی ساکارید توسط اسید تری فلورواستیک به واحدهای مونوساکاریدی سازنده خود هیدرولیز شد و پس از استیله شدن و تبدیل به استات های آلدیتول مرتبط، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. نتایج حاصل نشان داد که پلی ساکارید کاملاً خالص از واحدهای مونوساکاریدی زایلوز (Xyl)، گلوکز (Glc) و گالاکتوز (Gal)، به ترتیب با نسبت های مولی $2/1$ ، $2/9$ ، $1/0$ تشکیل شده است (شکل ۳-۴ بخش A).



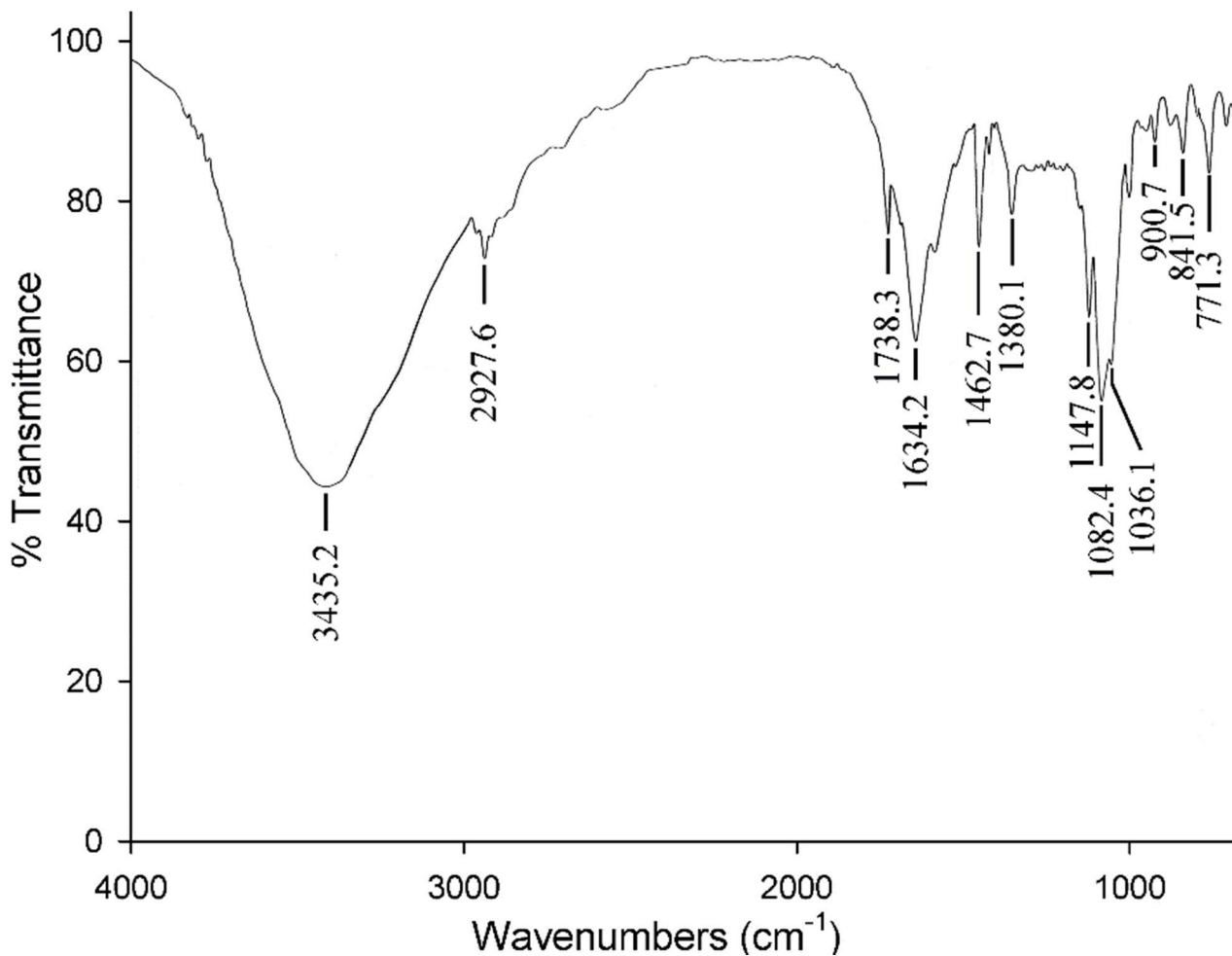
شکل ۳-۴: طیف کروماتوگرام گازی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید (A) و پلی ساکارید خالص احیا شده (B).

مقدار اسیدهای ارونیک با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد و نشان داد که پلی ساکارید خالص حدود ۱۷٪ اسید ارونیک دارد. لذا می توان نتیجه گرفت که پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی از نوع اسیدی است. بمنظور تأیید حضور اسید ارونیک در ساختار پلی ساکارید خالص و تشخیص نوع آن، پلی ساکارید خالص توسط NaBH_4 احیاء شد که در نتیجه آن تمام گروه های -COOH به گروه های $\text{-CH}_2\text{OH}$ احیا شدند. سپس مراحل ذکر شده در مورد پلی ساکارید خالص،

عیناً برای پلی ساکارید خالص احیا شده انجام و محصول به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید (شکل ۴-۳ بخش B). نتایج نشان داد که پلی ساکارید خالص احیا شده از واحدهای مونوساکاریدی زایلوز، گلوکز و گالاکتوز، به ترتیب با نسبت های مولی ۲/۳، ۴/۱، ۱/۰ تشکیل شده است. مقایسه بین ترکیب و نسبت واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص و پلی ساکارید خالص احیا شده نشان می دهد که مقدار گلوکز در پلی ساکارید خالص احیا شده افزایش یافته است. با محاسبه مقدار گلوکز اضافی می توان استنباط کرد که مقدار اسید ارونیک پلی ساکارید خالص ۱۶/۲٪ است و نوع آن اسید گلوکورونیک می باشد. مقدار اسید ارونیک حاصل از آزمون کروماتوگرافی بسیار نزدیک به مقدار اسید ارونیک حاصل از آزمون اسپکتروفوتومتری (حدود ۱۷٪) بود. نتایج آزمون تعیین واحدهای مونوساکاریدی پلی ساکارید خالص بیانگر این واقعیت است که واحدهای گلوکز و زایلوز مونوساکاریدهای اصلی سازنده پلی ساکارید ریشه مریم گلی ارغوانی هستند و به احتمال زیاد در ساختار اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص قرار گرفته اند. سایر واحدهای مونوساکاریدی نظیر گالاکتوز و اسید گلوکورونیک از لحاظ مقدار در اولویت بعدی قرار گرفته اند. لذا می توان نتیجه گرفت که پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی دارای ماهیت اسیدی است و نوعی زایلو گلوکان محسوب می شود. در حالیکه طبق مطالعات انجام شده توسط وانگ و همکاران روی پلی ساکارید ریشه مریم گلی میلیورهیزا مشخص شد که پلی ساکارید این گیاه بطور عمده از گلوکز تشکیل شده و زنجیره اصلی آن را آلفا-د- گلوکز تشکیل می دهد و پلی ساکارید اسیدی در آن مشاهده نشده است (Wang et al., 2006). بعلاوه طبق مطالعاتی که توسط کاپک در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت مونوساکاریدهای شناسایی شده در پلی ساکارید خالص اندام های هوایی گیاه مریم گلی معمولی شامل گالاکتوز ۱۱۷/۹٪، ۳- O - متیل گالاکتوز ۳٪، گلوکز ۱۵/۵٪، مانوز ۸/۳٪، آرابینوز ۳۰/۴٪، زایلوز ۷/۶٪، فوکوز ۲/۶٪، رامنوز ۶/۷٪ و اسید اورونیک ۰/۸٪ بود. بنابراین در بین واحدهای مونوساکاریدی، آرابینوز و گالاکتوز بیشترین سهم را در ساختار پلی ساکارید خالص مریم گلی معمولی داشتند در حالیکه گلوکز و زایلوز بالاترین سهم را در ساختار پلی ساکارید خالص مریم گلی ارغوانی دارا بودند.

۴-۲-۳ طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص

از طیف مادون قرمز پلی ساکارید بمنظور شناسایی گروه های عاملی موجود در ساختار پلی ساکارید حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی استفاده شد (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴: طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص.

وجود یک پیک قوی در ناحیه $3435/2 \text{ cm}^{-1}$ و یک پیک ضعیف در ناحیه $2927/6 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب نشان دهنده گروه های هیدروکسیل متصل به اتم کربن و اتصالات C-H کربن شماره ۶ قند است. جذب در ناحیه $1738/3 \text{ cm}^{-1}$ بیانگر وجود گروه های کربوکسیل در ساختار پلی ساکارید خالص

است. این نتیجه با نتایج حاصل از آنالیز حضور اسید گلوکورونیک (۱۶/۲٪) در ساختار پلی ساکارید خالص مطابقت داشت. پیک پهن موجود در محدوده $1634/2 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهندهٔ اتصالات آب و جذب در نواحی $1462/7 \text{ cm}^{-1}$ و $1380/1$ بیانگر ارتعاشات C-H در ساختار حلقه است. بعلاوه پیک موجود در نواحی $1082/4$ و $1036/1$ مربوط به اتصالات الکلی C-O (C-O-C) و پیک در ناحیه $1147/8 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به اتصالات اتری C-O (C-O-H) است. جذب در ناحیه $841/5 \text{ cm}^{-1}$ کنفورماسیون آنومری α را در واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص نشان داد. این نتیجه با نتیجه حاصل از درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص همخوانی داشت. جذب در ناحیه cm^{-1} $900/7$ نشان دهنده وجود کنفورماسیون آنومری β در ساختار پلی ساکارید خالص است. بعلاوه باند موجود در ناحیه $771/3 \text{ cm}^{-1}$ وجود حلقه های پیرانوزی را در ساختار قند مشخص کرد. با جمع بندی اطلاعات ذکر شده از طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص می توان عنوان کرد که پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی، اسیدی است و از واحدهای مونوساکاریدی پیرانوزی به همراه هر دو نوع اتصالات آنومری α و β تشکیل شده است.

۴-۲-۴ هیدرولیز ناقص اسیدی

همانطور که در بخش مواد و روش ها (۳-۳-۴-۶) اشاره شد چهار فرکشن پلی ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)، پلی ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)، پلی ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز) و پلی ساکارید ۴ (فراکشن بیرون از کیسه دیالیز) پس از انجام هیدرولیز ناقص اسیدی از پلی ساکارید خالص بازیافت و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، پس از هیدرولیز کامل توسط اسید تری فلورواستیک، آنالیز شدند

جدول ۴-۱: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص.

فراکشن ها	نسبت های مولی			
	زایلوز	گلوکز	گالاکتوز	اسید گلوکورونیک
پلی ساکارید ۱	۱/۰۰	۱/۵۳	_____	_____
پلی ساکارید ۲	۱/۰۰	۱/۴۸	_____	_____
پلی ساکارید ۳	_____	_____	۱/۰۰	۱/۰۵
پلی ساکارید ۴	_____	_____	۱/۰۰	۱/۱۳

نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی (جدول ۴-۱) نشان داد که مونوساکاریدهای زایلوز و گلوکز موجود در پلی ساکاریدهای ۱ و ۲، سازنده اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی هستند و مونوساکاریدهای گالاکتوز و اسید گلوکورونیک موجود در پلی ساکاریدهای ۳ و ۴ احتمالاً واحدهای مونومری سازنده شاخه های پلی ساکارید خالص هستند.

۴-۲-۵ اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت

نتایج مربوط به اکسیداسیون پریودات نشان داد که ۱/۳۱ مول پریودات مصرف شد و حدود ۰/۲۹ مول اسید فرمیک تولید گردید. مقدار تولید اسید فرمیک بیانگر این است که در حدود ۲۹٪ از اتصالات موجود در ساختار پلی ساکارید خالص از نوع (۱→۲) یا (۱→۶) است. مقدار پریودات مصرفی بیش از ۲ برابر اسید فرمیک تولیدی بود که بیانگر این واقعیت است که اتصالاتی مانند (۱→۲) و (۱→۴) در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارند که قادر به تولید اسید فرمیک نیستند و سهم آن ها حدود ۷۱٪ است. با مشاهده مقدار ۱/۳۱ مول پریودات مصرفی همچنین می توان عنوان کرد که اتصالات (۱→۳) و مشتقات آن مانند (۱→۲و۳)، (۱→۳و۴) و (۱→۳و۶) در ساختار پلی ساکارید خالص وجود ندارند یا مقدار آن ها بسیار ناچیز است. آنالیز کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات کاملاً هیدرولیز شده بیانگر عدم حضور زایلوز، گلوکز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک بود که نشان می دهد تمام واحدهای مونوساکاریدی نام برده در ساختار پلی ساکارید

خالص حاوی اتصالاتی هستند که توسط پریودات اکسید می شوند مانند (۱→۲)، (۱→۶)، (۱→۲)، (۱→۲و۶)، (۱→۴)، (۱→۴و۶). اریتریتول، گلیسرول و اسید گلیسریک (تولید شده از اسید گلوکورونیک) در محصولات حاصل از پریودات مشاهده شد. حضور گلیسرول بیانگر حضور اتصالاتی مانند (۱→۶) و (۱→۴) در ساختار پلی ساکارید خالص است و حضور اسید گلیسریک نیز مفهوم مشابهی دارد. بعلاوه حضور اریتریتول نشان می دهد که اتصالاتی مانند (۱→۴) و (۱→۴و۶) نیز در ساختار پلی ساکارید خالص حضور دارند.

جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص

فراکشن ها	نسبت های مولی						
	اریتریتول	گلیسرول	اسید گلیسریک	زایلوز	گلوکز	گالاکتوز	اسید گلوکورونیک
محصولات اکسیداسیون پریودات							
هیدرولیز کامل اسیدی	۰/۹۷	۱/۰۰	۰/۳۴	_____	_____	_____	_____
تجزیه اسمیت							
بیرون کیسه دیالیز	۱/۰۱	۱/۰۰	۰/۳۱	_____	_____	_____	_____
روی کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
رسوب در کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

عدم مشاهده رسوب در کیسه دیالیزی نشان می دهد که اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص کاملاً توسط پریودات اکسید شده است. از این رو اتصالات (۱→۳) و مشتقات آن در ساختار پلی ساکارید خالص وجود ندارد. با جمع بندی مطالب ذکر شده می توان عنوان کرد که اتصالاتی مانند (۱→۴)، (۱→۴و۶)، (۱→۴) و (۱→۶) احتمالاً در ساختار پلی ساکارید ریشه های مریم گلی ارغوانی وجود دارند.

۴-۲-۶ متیله کردن

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی حضور ۴ پیک متفاوت را نشان داد (جدول ۴-۳). این پیک ها پس از شناسایی عبارت بودند از ۳و۲ - دی متیل زایلوز، ۶و۳و۲ - تری متیل گلوکز، ۳و۲-دی متیل گلوکز و ۴و۳و۲- تری متیل گالاکتوز که به ترتیب با نسبت های مولی ۲/۲۷، ۲/۳۱، ۱/۱۶ و ۱/۰۹ (حدود ۲، ۲، ۱ و ۱) در ساختار پلی ساکارید خالص وجود داشتند. همانطور که قبلا عنوان شد پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی اسید گلوکورونیک دارد لذا برای تعیین نوع اتصال آن آزمون متیله کردن روی پلی ساکارید احیا شده انجام گرفت که نتایج حاصل نشان داد که ۳و۲ - دی متیل زایلوز، ۶و۳و۲ - تری متیل گلوکز، ۳و۲ - دی متیل گلوکز، ۴و۳و۲ - تری متیل گالاکتوز و ۴و۳و۲ - تترا متیل گلوکز (تولید شده از اسید گلوکورونیک) به ترتیب به نسبت های مولی ۲/۲۳، ۲/۲۹، ۱/۱۸، ۱/۰۷، ۱/۱۴ (حدود ۲، ۲، ۱، ۱ و ۱) در ساختار پلی ساکارید خالص وجود داشتند از این رو نوع اتصالات اسید گلوکورونیک (۱→) تعیین شد.

جدول ۴-۳: نتایج کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص متیله شده

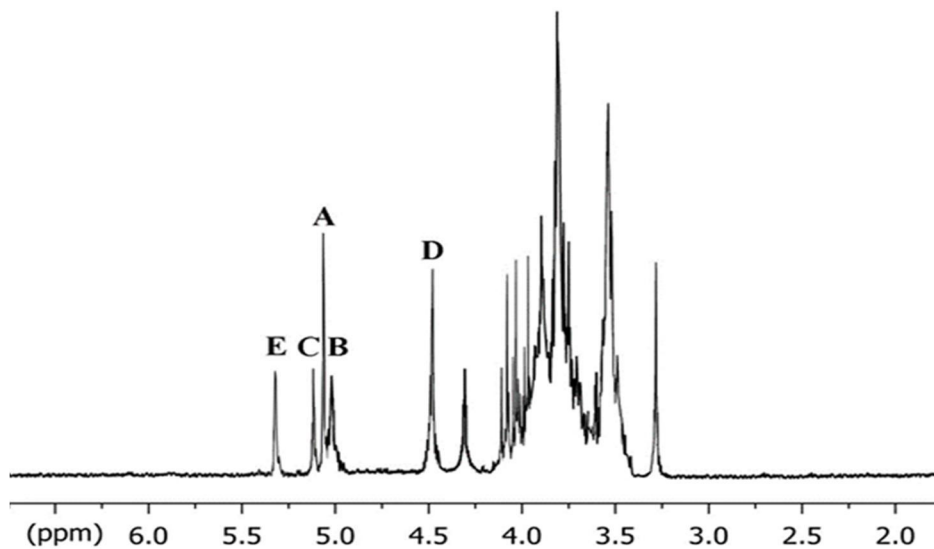
قند متیله شده	نوع اتصال	فراگمت های جرمی (m/z)	نسبت های مولی	
			پلی ساکارید خالص	پلی ساکارید خالص احیا شده
2,3-Me ₂ -Xyl	→4)-Xylp-(1→	۴۳، ۵۹، ۷۱، ۸۷، ۱۰۱، ۱۱۸، ۱۲۹، ۱۸۹	۲/۲۷	۲/۲۳
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-GlcP-(1→	۴۳، ۴۵، ۵۹، ۸۷، ۹۹، ۱۰۲، ۱۱۳، ۱۱۸، ۱۲۹، ۱۶۲، ۲۳۳	۲/۳۱	۲/۲۹
2,3-Me ₂ -Glc	→4,6)-GlcP-(1→	۴۳، ۸۵، ۱۰۲، ۱۱۸، ۱۲۷، ۱۶۲، ۲۰۱، ۲۶۱	۱/۱۶	۱/۱۸
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Galp-(1→	۴۳، ۸۷، ۹۹، ۱۰۱، ۱۱۷، ۱۲۹، ۱۶۱، ۱۸۹، ۲۳۳	۱/۰۹	۱/۰۷
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	GlcPA-(1→	۱۰۱، ۱۱۷، ۱۲۹، ۱۶۱، ۱۸۹، ۲۳۳	—	۱/۱۴

نسبت های مولی ذکر شده با نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص و آزمون اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت سازگاری داشت. نسبت مولی گلوکز با اتصال (۴۰۶→۱) که محل انشعاب را نشان می دهد با نسبت مولی اسید گلوکورونیک با اتصال (۱→۱) همخوانی داشت که نشان دهنده^۱ این حقیقت است که تمام انشعابات پلی ساکارید خالص بوسیله واحدهای اسید گلوکورونیک به انتها می رسد. عدم قرارگیری گروه متیل روی کربن شماره ۵ تمام واحدهای مونومری ذکر شده نشان می دهد که تمام مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید خالص از ساختار حلقه های پیرانوز تشکیل شده اند که با نتیجه حاصل از طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص (سیگنال $771/3 \text{ cm}^{-1}$) سازگاری داشت. با جمع بندی نتایج حاصل از این بخش می توان عنوان کرد که پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی از واحدهای مونومری با اشکال پیرانوزی و اتصالات (۴→۱)، (۴۰۶→۱)، (۶→۱) و (۱→۱) تشکیل شده است که با نتایج آزمون اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت سازگاری داشت. بعلاوه بالا بودن سهم اتصالات (۴→۱) نشان می دهد که به احتمال زیاد اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص در برگیرنده اتصال ذکر شده می باشد.

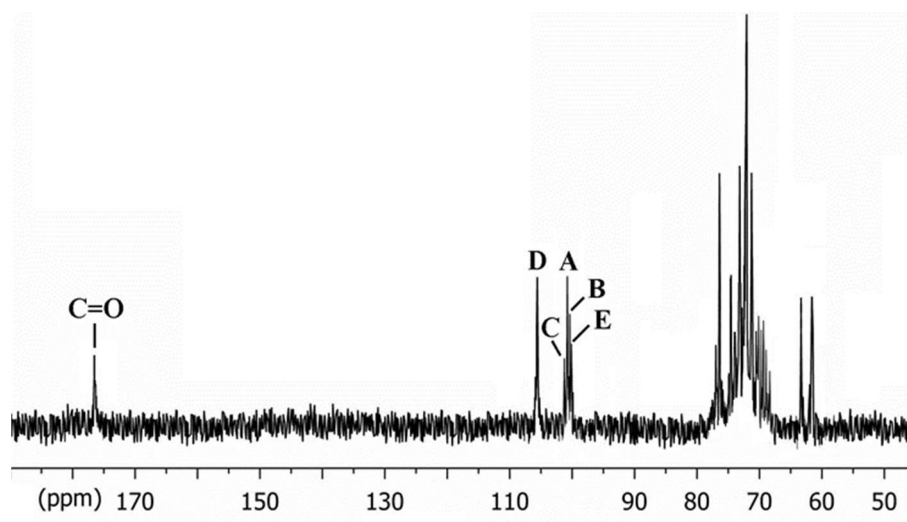
۴-۲-۷ NMR پلی ساکارید خالص

شکل ۴-۵، NMR پروتون پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی را نشان می دهد. با رجوع به بخش آنومری شکل ۴-۵ (سیگنال های محدوده ۴/۵-۵/۵ ppm)، پنج سیگنال آنومری متفاوت دیده می شود که احیاناً مربوط به ۵ ترکیب مختلف می باشد و با حروف A-D در شکل ۴-۵ مشخص شده است. این نتیجه با نتایج حاصل از بخش متیله کردن پلی ساکارید خالص که بیانگر حضور ۵ ترکیب مختلف در پلی ساکارید خالص بود مطابقت داشت. به علت اینکه سیگنال های محدوده ۳-۴/۵ ppm طیف پروتون پلی ساکاریدها هم پوشانی بالایی دارد و تمایز سیگنال ها براحتی ممکن نیست، طیف NMR کربن پلی ساکارید ریشه مریم گلی ارغوانی اندازه گیری شد (شکل ۴-۶). همان طور که در شکل ۴-۶ مشاهده می شود وجود ۵ سیگنال آنومری A-D که در

NMR پروتون قبلا مشاهده شده بود مجددا در طیف NMR کربن پلی ساکارید خالص رویت شد. بعلاوه وجود سیگنال در محدوده ۱۷۶/۸ ppm مربوط به کربن شماره ۶ گروه کربوکسیل اسید گلوکورونیک است که قبلا با آزمایشات مختلف وجود آن اثبات شده بود.

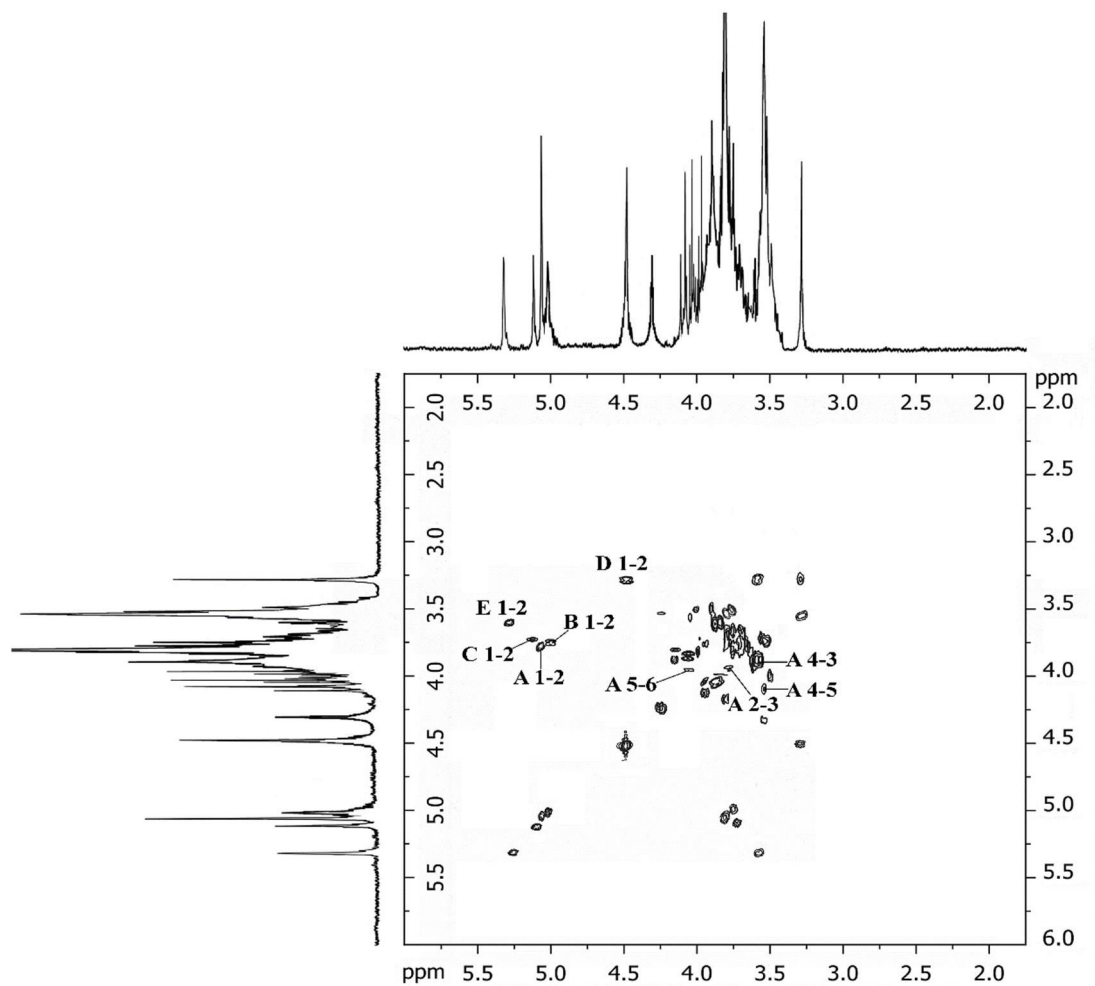


شکل ۴-۵: طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص.

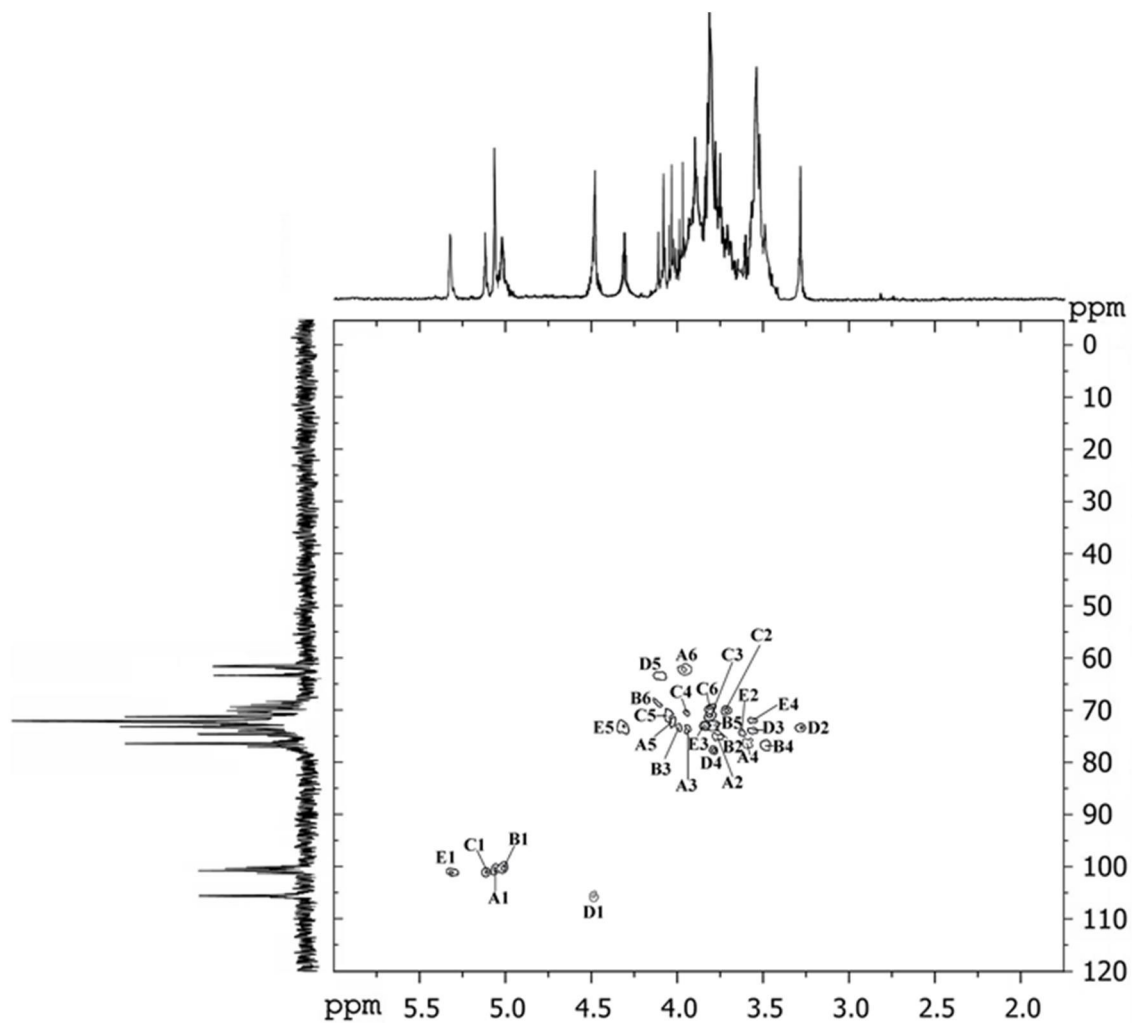


شکل ۴-۶: طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص.

بمنظور پی بردن به سیگنال های مربوط به تمام پروتون ها و نیز کربن های متناظر با آن ها در واحدهای تشکیل دهنده پلی ساکارید خالص (A-D) به ترتیب از طیف NMR های دو بعدی $^1\text{H} - ^1\text{H}$ و COSY و $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC استفاده شد. (اشکال ۷-۴ و ۸-۴). همانطور که در شکل ۷-۴ مشاهده می شود پروتون های مجاور هم در کربن های آنومری اجزای A-D در بخش چپ شکل مشخص شده اند و بعنوان نمونه برای جزء A تمام پروتون های متناظر با هم از کربن شماره ۱ تا کربن شماره ۶ مشخص شده است. با توجه به سیگنال پروتون های مشخص شده در شکل ۷-۴ می توان از طیف $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC برای مشخص کردن کربن های متناظر با هر پروتون بهره گرفت (شکل ۸-۴).



شکل ۷-۴: طیف $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY پلی ساکارید خالص.



شکل ۴-۸: طیف $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC پلی ساکارید خالص.

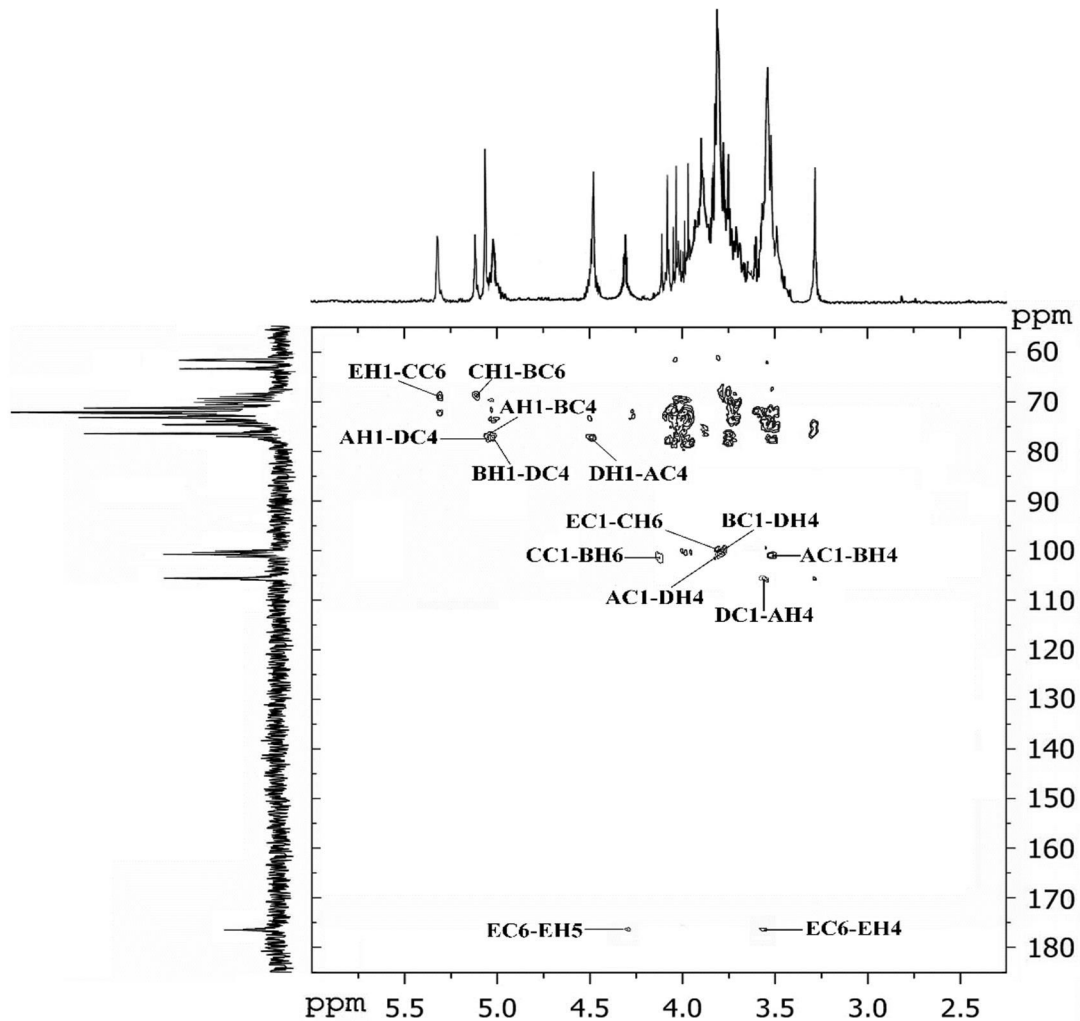
همانطور که در شکل ۴-۸ مشخص است، سیگنال کربن های متناظر با هر پروتون در اجزای A-D کاملاً تفکیک شده اند که نتایج آن در جدول ۴-۴ آمده است. با مراجعه به جدول ۴-۴، اجزای A-D بر حسب نوع مونوساکارید و اتصال از یکدیگر تفکیک شده اند.

جدول ۴-۴: مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون و کربن پلی ساکارید خالص

جزء	نوع اتصال	جابجایی شیمیایی δ (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
		(H-1)	(H-2)	(H-3)	(H-4)	(H-5)	(H-6)
(A)	$\rightarrow 4$ - α -D-Glcp-(1 \rightarrow)	100.4 (5.04)	72.6 (3.78)	73.4 (3.89)	77.0 (3.57)	71.5 (4.03)	61.8 (3.97)
(B)	$\rightarrow 4,6$ - α -D-Glcp-(1 \rightarrow)	100.3 (5.01)	72.4 (3.76)	73.1 (4.00)	77.3 (3.50)	70.7 (3.75)	68.8 (4.13)
(C)	$\rightarrow 6$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow)	100.7 (5.13)	69.7 (3.73)	70.5 (3.78)	70.3 (3.91)	70.9 (4.06)	69.2 (3.79)
(D)	$\rightarrow 4$ - β -D-Xylp-(1 \rightarrow)	105.2 (4.49)	73.5 (3.28)	74.6 (3.56)	77.1 (3.80)	63.2 (4.09)	____ (____)
(E)	α -D-GlcpA-(1 \rightarrow)	100.1 (5.31)	72.6 (3.59)	73.0 (3.77)	71.8 (3.56)	72.5 (4.31)	176.8 (____)

وجود سیگنال در ۱۰۰/۱، ۱۰۰/۳، ۱۰۰/۴ و ۱۰۰/۷ ppm به ترتیب کربن های آنومری آلفا - D - اسید گلوکورونیک، آلفا - D - گلوکوپیرانوز با اتصال (۴ \rightarrow ۱)، آلفا - D - گلوکوپیرانوز با اتصال (۴ \rightarrow ۱) و آلفا - D - گالاکتوپیرانوز با اتصال (۶ \rightarrow ۱)، را نشان می دهد. سیگنال ۱۰۵/۲ ppm کربن آنومری بتا - D - زایلوپیرانوز با اتصال (۴ \rightarrow ۱) را نشان می دهد زیرا عموماً سیگنال های کربن های آنومری نوع آلفا در محدوده ۱۰۰-۱۰۲ ppm و نوع بتا معمولاً در بالاتر از ۱۰۳ ppm ظاهر می شود. بعلاوه تمام اجزای A-D دارای حلقه های پیرانوزی هستند زیرا سیگنال حلقه های فورانوزی واحدهای قندی در محدوده ۱۱۰-۱۰۶ ppm از طیف NMR کربن ظاهر می شود. نتایج ذکر شده با نتایج حاصل از آزمون های متیله کردن، طیف مادون قرمز، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت و

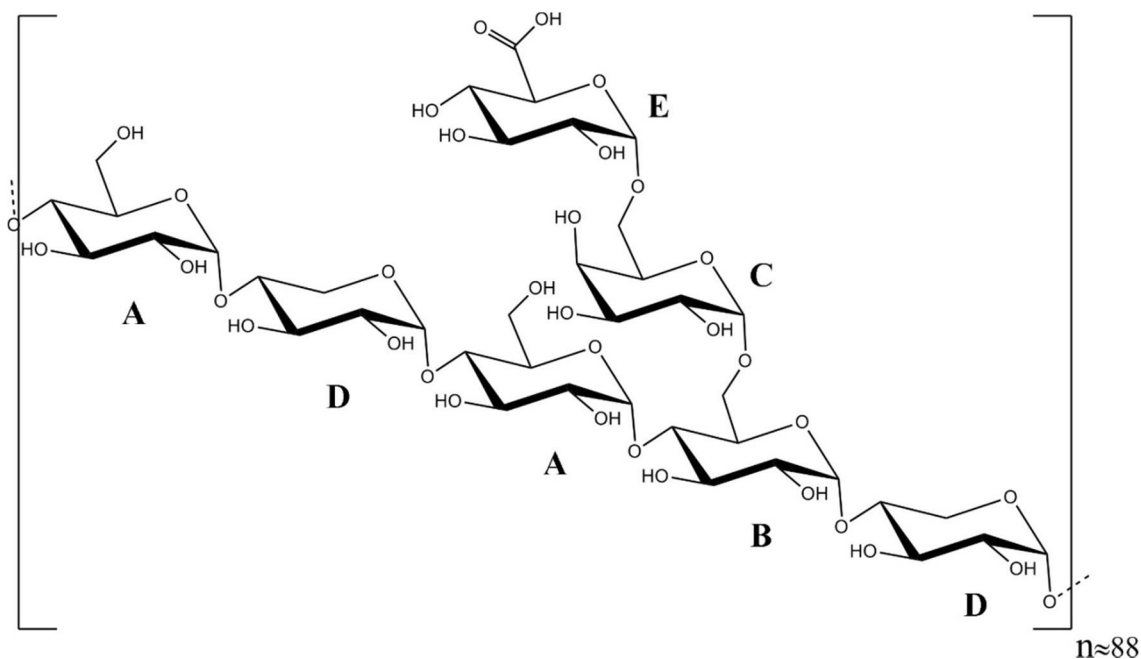
کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص سازگاری داشت. به منظور شناسایی سکانس واحدهای گلیکوزیدی در ساختار پلی ساکارید خالص از طیف HMBC استفاده شد (شکل ۹-۴). همانطور که در شکل ۹-۴ مشخص است همبستگی بین اجزای A-D به شرح زیر مشخص گردید.



شکل ۹-۴: طیف HMBC پلی ساکارید خالص.

وجود همبستگی بین پروتون شماره ۱ جزء A و کربن شماره ۴ جزء D و نیز کربن شماره ۱ جزء A و پروتون شماره ۴ جزء D بیانگر این است که جزء A از طریق پیوند ۴→۱ به جزء D متصل شده است. چنین همبستگی بین پروتون شماره ۱ جزء D و کربن شماره ۴ جزء A و نیز کربن شماره ۱ جزء D و پروتون شماره ۴ جزء A نیز مشاهده شد که نشان می دهد جزء D نیز از طریق پیوند ۴→۱

به جزء A متصل شده است. وجود همبستگی بین پروتون شماره ۱ جزء A و کربن شماره ۴ جزء B و نیز کربن شماره ۱ جزء A و پروتون شماره ۴ جزء B بیانگر این است که جزء A از طریق پیوند ۱→۴ به جزء B متصل شده است. وجود همبستگی بین پروتون شماره ۱ جزء B و کربن شماره ۴ جزء D و کربن شماره ۱ جزء B و پروتون شماره ۴ جزء D نشان دهنده اتصال جزء B به D از طریق پیوند ۱→۴ است. مشاهده همبستگی بین پروتون شماره ۱ جزء C و کربن شماره ۶ جزء B و نیز کربن شماره ۱ جزء C و پروتون شماره ۶ جزء B بیانگر اتصال جزء C از طریق پیوند ۱→۶ به جزء B است. در نهایت وجود همبستگی بین پروتون شماره ۱ جزء E و کربن شماره ۶ جزء C و نیز کربن شماره ۱ جزء E و پروتون شماره ۶ جزء C نشان می دهد که جزء E از طریق پیوند ۱→۶ به جزء C متصل شده است. هیچ نوع همبستگی دیگری بین جزء E با سایر اجزا مشاهده نشد که نشان دهنده این واقعیت است که جزء E در انتهای زنجیره جانبی قرار گرفته است. با جمع بندی نتایج حاصل از تمام آزمون های شیمیایی و آنالیز دستگامی، ساختار پیشنهادی برای پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه مریم گلی ارغوانی در شکل ۴-۱۰ آمده است. طبق مطالعات توسط کاپک در سال ۲۰۰۹ مشخص شد که ساختار پلی ساکارید خالص مریم گلی معمولی از اسکلت اصلی گلوکو پیرانوزیل و مانو پیرانوزیل و زنجیر جانبی آن از واحدهای آلفا گلوکوزیل و مانوزیل در موقعیت کربن شماره ۶ تشکیل شده است (Capek, 2009). بعلاوه با مطالعه روی پلی ساکاریدهای ریشه های مریم گلی میلیتورهیزا مشخص شد که ساختار پلی ساکارید نوع اول آن از آلفا-د- گلوکز با اتصالات ۱ به ۶ و مقدار کمی آلفا-د- گلوکز با اتصالات ۱ به ۲ و ساختار پلی ساکارید نوع دوم آن از آلفا-د- گلوکز با اتصالات ۱ به ۶ تشکیل شده است (Wang et al., 2006) در حالیکه اسکلت اصلی پلی ساکارید مریم گلی ارغوانی از آلفا-د-گلوکو پیرانوز با اتصالات (۱→۴) و (۱→۶) و بتا-د-زایلو پیرانوز با اتصالات (۱→۴) و شاخه های جانبی آن از واحدهای گالاکتوز با اتصالات (۱→۶) و اسید گلوکورونیک با اتصالات (۱→۶) در انتهای زنجیره جانبی تشکیل شده است.



شکل ۴-۱: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی.

نتیجه گیری

در این پژوهش پلی ساکارید خام حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی پس از فرایند استخراج با آب 70°C پروتئین زدایی به روش سواگ و ترسیب با اتانول با استفاده از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو - سلولز و سفاکریل S-400 خالص سازی شد. پلی ساکارید خالص حاوی ۹۸/۹٪ قند و فاقد پروتئین بود. میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های مریم گلی ارغوانی ۹۵۸۰۰ دالتون و پیک آن کاملاً متقارن و همگن بود. آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید نشان داد که واحدهای مونومری زایلوز (Xyl)، گلوکز (Glc)، گالاکتوز (Gal) و اسید گلوکورونیک (GlcA) به ترتیب با نسبت های مولی ۲/۱، ۲/۹، ۱/۰ و ۱/۲ ساختار پلی ساکارید خالص را تشکیل می دهد. با استفاده از روش های شیمیایی و دستگاهی مانند متیله کردن، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، تعیین درجه چرخش نوری، کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی، طیف سنج مادون قرمز و طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای تک بعدی و دو بعدی ساختار پلی ساکارید خالص بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که گلوکز و زایلوز مونومرهای اصلی

سازنده پلی ساکارید خالص ریشه های مریم گلی ارغوانی با اتصالات (۱→۴) هستند و زنجیر اصلی در کربن شماره ۶ گلوکز منشعب شده است که شامل گالاکتوز با اتصالات (۱→۶) و اسید گلوکورونیک با اتصالات (۱→) در انتهای زنجیر جانبی است.

پیشنهادات:

با توجه به شناسایی ساختار مریم گلی ارغوانی موارد زیر جهت ادامه مطالعه پیشنهاد می شود.

- ✓ خواص رئولوژیکی و جریان
- ✓ خواص تشکیل فیلم
- ✓ خواص تغذیه ای
- ✓ خواص ضد اکسندگی
- ✓ خواص دارویی مانند ضد توموری سرطانی

فصل پنجم

فهرست منابع

منابع:

- ۱) امیری ح، (۱۳۹۰)، شناسایی مواد تشکیل دهنده و بررسی اثرات آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی گیاه *Salvia multicaulis Vahl*، فصلنامه گیاهان داروئی، شماره ۸، ص ۱۱۱ - ۱۱۷.
- ۲) باقری ا، (۱۳۸۴)، "شیمی دستگاهی مبانی کاربرد"، جلد اول، چاپ اول، انتشارات ناقوس.
- ۳) باقری ا، (۱۳۸۴)، "شیمی دستگاهی مبانی کاربرد"، جلد دوم، چاپ اول، انتشارات ناقوس.
- ۴) جبلی جوان ا، رنجبر ندامانی آ، رنجبر ندامانی ا، (۱۳۹۳)، "شیمی کربوهیدرات های مواد غذایی"، چاپ اول، انتشارات دانشگاه سمنان.
- ۵) جهان بین ک، (۱۳۹۰)، رساله دکتری: "استخراج، شناسایی و تعیین پلی ساکاریدهای محلول در آب حاصل از ریشه گیاه چوبک تماشایی"، دانشگاه تهران.
- ۶) جهان بین ک، بیگی م، (۱۳۹۶)، "جداسازی و شناسایی ساختار گلوکومانان موجود در ریشه گیاه سریش ایرانی *Eremurus persicus*". علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۴ (۶۳)، ص ۲۷۷ - ۲۸۸.
- ۷) دانیال زاده آ، زارعیان خ، (۱۳۷۴)، "اصول زیست شیمی"، جلد اول، چاپ ششم، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.
- ۸) شعبانی فر ا، (۱۳۹۲)، "بررسی و مقایسه ویژگی انواع صمغ های مورد استفاده در صنایع غذایی"، همایش ملی امنیت غذایی دانشگاه آزاد سواد کوه.
- ۹) صمصام شریعت ه، (۱۳۸۶)، "عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان داروئی چاپ دوم انتشارات مانی.
- ۱۰) علمی آخوندی ا، (۱۳۷۰)، "مقدمه ای بر بیوشیمی کاربردی"، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.
- ۱۱) فاطمی ح، (۱۳۸۰)، "شیمی مواد غذایی"، چاپ دوم، شرکت سهامی انتشار، تهران.
- ۱۲) کرامت ج، (۱۳۸۷)، "مبانی شیمی مواد غذایی"، چاپ اول، مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان.
- ۱۳) مظفریان و (۱۳۷۵)، "فرهنگ نام های گیاهان ایران"، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران.

۱۴) احمدی مجد م، رسولی م، (۱۳۹۲)، "بررسی خواص دارویی و کاربردهای گیاه دارویی گیاه مریم

گلی *Salvia officinalis* همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار دانشگاه همدان.

15. Amin A. M., Ahmad A. S., Yin Y. Y., Yahya N. and Ibrahim N. (2007) "Extraction, purification and characterization of durian (*Duriozibethinus*) seed gum" **J. of. Food hydrocolloids**, 21, 2, pp 273-275.
16. Angyal S. J. and James K. (1970) "Oxidation of carbohydrates with chromium trioxide in acetic acid" **Australian J. of .Chemistry**, 23, pp 1209-1215.
17. Aspinall G. O. (1972), "**The Polysaccharides**", Vol.1, Academic Press, New York.
18. Bao H., You S., Cao L., Zhou R., Wang, Q. and Cui S. W. (2016) "Chemical and rheological properties of polysaccharides from fruit body" **J. of .Auricularia auricular-judae. Food Hydrocolloids**, 57, pp 30-37.
19. BeMiller J. N. (1996). Gums/hydrocolloids: Analytical aspects, In:"**Carbohydrates in Food**", Eliasson A-C. Edition, Marcel Dekker, New York.
20. Carlotto J., de Souza L. M., Baggio C. H., Werner M. F. d. P., Maria-Ferreira D., Sasaki G. L., Iacomini m. and Cipriani T. R. (2016) "Polysaccharides from *Arctiumlappa* L.: Chemical structure and biological activity" **International J. of .Biological Macromolecules**, 91, pp 954-960.
21. Carraher C. E. (2000), "**Seymour/Carraher's Polymer Chemistry**" New York: Marcel Dekker, pp 52-95.
22. Capek P. (2009) "A water soluble glucomannan isolated from an immunomodulatory active polysaccharide of *Salvia officinalis* L" **J. of .Carbohydrate polymers**, 75, 2, pp 356-359.
23. Capek P. (2008) "An arabinogalactan containing 3-O-methyl-D-galactoseresidues isolated from the aerial parts of *Salvia officinalis* L" **J. of .Carbohydrate Research**, 343, pp 1390- 1393.
24. Capek p. and Hribalova V. (2004) "Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis*L. possessing immunomodulatory activity" **J. of .Phytochemistry**, 62, pp 1983-1992.
25. Capek P. and Kardašová A. (1995) "Polysaccharides from the flowers of *Malva mauritiana*L.:a, structure of anarabinogalactan" **J. of .Collection of Czechoslovak chemical communications**, 60, 12, pp 2112-2118.
26. Chaplin M. F. and Kennedy J. F. (1994), "**Carbohydrate Analysis. A**

Practical Approach”, Oxford University Press, New York.

27. Chaubey M. and Kapoor V. P. (2001) “Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia*Vahl” **J. of .Carbohydrate research**, 332, 4, pp 439-444.
28. Classen B. and Blaschek W. (1998) “High molecular weight acidic polysaccharides from *Malvasylvestris* and *Alcearosea*” **J. of .Plantamedica**, 64, 07, pp 640-644.
29. Cui S. W. (2005), “**Seymour/caraherr’s polymer Chemistry, Physical properties, and application**”, CRC Press, New York.
30. Dabrowski J. (1994). Two-dimensional and related NMR methods in structural analyses of oligosaccharides and polysaccharides, pp 741-780, In:“**Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists**”, Second Edition, Croasmun W. R. and Carlson R.M. Eds, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.
31. Deman j. (1999), “**Principles of Food chemistry**”, Springer-velage, NewYork.
32. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. and Smith F. (1956) ”Colorimetric method for determination of sugars and related substances”, **Analytical chemistry**, 28(3), pp 350-356.
33. Ebrahimabadi A. H., Mazoochi A., Kashi F. J., Djafari-Bidgoli Z. and Batooli H. (2010) “Essential oil composition and antioxidant and antimicrobialproperties of the aerial parts of *Salvia eremophila*Boiss” **J. of .Food and chemical toxicology**, 48, 5, pp1371-1376.
34. El Khadem H. S. (1988), “**Carbohydrate Chemistry; Monosaccharides and Their Oligomers**”, Academic Press, San Diego.
35. Ellefson W. (2005). HPLC of Mono-and disaccharids using refractive index detection, pp 661-669, In: “**Handbook of food analytical chemistry**”, Wrolastade R. E., Reiad D. S., Smith D. M., Penner M. H., Decker E. A., Sporns P., Hoboken N. J., John Wiley and Sons.
36. Englyst H. N. and Cummings J. H. (1984) “Simplified method for the measurementof total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituentsugars as aldelol acetates” **J. of .Analyst**, 109, pp937-942.
37. Filisetti-Cozzi T. M. and Carpita N. C. (1991) “Measuremnt of uronic acids without interference from neutral sugars” **J. of .Analytical biochemistry**, 1, pp 157-162.

38. Fox B. A. and Cameron A. G. (1977), “**Food science-a. chemical approach**”, third Edition, Hodder and Stoughton Ltd.
39. Garleb K. A., Bourquin L. D. and Fahey G. C. J. (1989) “Neutral monosaccharide and use of anionexchange high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection of monosaccharides” **J. of .Agricultural and Food Chemistry**, 37, pp 1287–1293.
40. Ghasemlou M., Khodaiyan F., Jahanbin K., Gharibzahedi S. M. T. and Taheri S. (2012) “Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefiran production yield from a low-cost culture medium” **J. of .Food chemistry**, 133, 2, pp 383-389.
41. Gong G., Fan J., Sun Y., Wu Y., Liu Y., Sun W., Zhang Y. and Wang Z. (2016) “Isolation, structural characterization, and antioxidativity of polysaccharide LBLP5-A from *Lycium barbarum* leaves” **J. of .Process Biochemistry**, 51, 2, pp 314-324.
42. Guo R., Ai L., Cao N., Ma J., Wu Y., Wu J. and Sun X.(2016) “Physicochemical properties and structural characterization of a galactomannan from *Sophora alopecuroides* L. seeds” **J. of .Carbohydrate polymers**, 140, pp 451-460.
43. Hakomori S. A. (1964) “rapid permethylation of glycolipids and polysaccharides catalyzed by methylsulfinylcarbanion in dimethylsulfoxide” **J. of .Biochemistry (Tokyo)**, 55, pp 205-208.
44. Harding S. E. (1998). Dilute solution viscometry of food biopolymers, pp 1-49, In: “**Functional Properties of Food Macromolecules Gaithersburg**”, Hill S. E., Ledward D. A. and Mitchell J. R., MD: Aspen Publisher.
45. Haworth W. N. (1915) “Haworth methylation” **J. of .the Chemical Society**, 107, pp 13-
46. He P., Zhang A., Zhou S., Zhang F., Linhardt R. J. and Sun P. (2016) “Structural elucidation of polysaccharide containing 3-O-methyl galactose from fruiting bodies of *Pleurotuscitrinopileatus*” **J. of .Carbohydrate research**, 434, pp 72-76.
47. Jahanbin K., Abbasian A. and Ahang M. (2017). “Isolation, purification and structural characterization of a new water-soluble polysaccharide from *Eremurus stenophyllus* (boiss. and buhse) baker roots” **J. of .Carbohydrate polymers**, 178, pp 386-393.
48. Jahanbin K. (2018). “Structural characterization of a new water-soluble polysaccharide isolated from *Acanthophyllum acerosum* roots and its

antioxidant activity. International” **J. of. biological macromolecules**, 107, pp 1227-1234.

49. Jahanbin K., Moini S., Gohari A. R., Emam-Djomeh Z. and Masi P. (2012) “Isolation, purification and characterization of a new gum from *Acanthophyllumbracteatum* roots” **J. of .Food hydrocolloids**, 27, 1, pp 14-21.
50. Jahanbin K., Gohari A. R., Moini S., Emam-Djomeh Z. and Masi P. (2011) “Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllumbracteatum* roots” **International J. of .biological macromolecules**, 49, 4, pp 567-572.
51. Jalali H. T., Ebrahimian Z. J., Evtuguin D. V. and Neto C. P. (2011) “Chemical composition of oleo-gum-resin from *Ferula gummosa*” **J. of .Industrial crops and products**, 33, 2, pp 549-553.
52. Khoo K.H. and Dell A. (1990) “Assignment of anomeric configurations of pyranose sugars in oligosaccharides using a sensitive FAB-MS strategy” **J. of .Glycobiology**, pp 183-91.
53. Komura D. L., Carbonero E. R., Gracher A. H. P., Baggio C. H., Freitas C. S., Marcon R., Santos A. R., Gorin P.A. and Iacomini M. (2010) “Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti inflammatory and antinociceptive properties” **J. of .Bioresource technology**, 101, 15, pp 6192-6199.
54. Lehninger A. L., Nelson D. L., and Cox M. M. (1942), “**Lehninger principles of biochemistry**”, New York, Worth Publishers.
55. Li J., Fan L. and Ding S. (2011) “Isolation, purification and structure of a new water-soluble polysaccharide from *Zizyphusjuzuba* cv. *Jinsixiaozao*” **J. of .Carbohydrate Polymers**, 83, 2, pp 477-482.
56. Lin K.Y., Daniel J. R. and Whistler R. L. (1994) “Structure of chia seed polysaccharide exudate” **J. of .Carbohydrate Polymers**, 23, 1, pp 13-18.
57. Lindberg B. L., Lönngrén J. and Svensson S. (1975) “Specific degradation of polysaccharides” **J. of .Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 31, pp 185-240.
58. Liu Y., Du Y. Q., Wang J. H., Zha X.Q. and Zhang J.B. (2014) “Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from *Jinjian* mushroom” **International J. of .biological macromolecules**, 64, pp 63-68.
59. Maity, P., Nandi, A. K., Manna, D. K., Pattanayak, M., Sen, I. K., Bhanja, S. K., and Islam, S. S. (2017) “Structural characterization and antioxidant activity of a glucan from *Meripilus giganteus*” **J. of .Carbohydrate polymers**, 157, 1237-1245.

60. Meng M., Cheng D., Han L., Chen Y. and Wang C. (2016) "Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *GrifolaFrondosa* fruiting body" **J. of .Carbohydrate Polymers**, 157, pp 1134-1143.
61. Min-Hui L., Jian-Min C., Yong P. and Pei- Gen, X. (2008) "Distribution of phenolic acids in Chinese *Salvia* plants" **J. of .World Science and Technology**, 10, 5, pp 46-52.
62. Molaei H. and Jahanbin K. (2018). "Structural features of a new water-soluble polysaccharide from the gum exudates of *Amygdalus scoparia* Spach (Zedo gum)" **J. of. Carbohydrate polymers**, 182, pp 98-105.
63. Niu Y., Wang H., Xie Z., Whent M., Gao X., Zhang X., Zou S., Yao W. and Yu L. (2011) "Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalusmembranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao" **J. of .Food chemistry**, 128, 3, pp 620-626.
64. Ohms J. I., Zec J., Benson J. V. and Patterson, J. A. (1967) "Column chromatography of neutral sugars: operating characteristics and performance of a newly available anion-exchange resin". **Analytical biochemistry**, 20(1), pp 51-57.
65. Ojha A. K., Maiti D., Chandra K., Mondal S., Roy D. D. S. K., Ghosh K. and Islam S. S. (2008) "Structural assignment of a heteropolysaccharide isolated from the gum of *Cochlospermumreligiosum* (Katira gum)" **J. of .Carbohydrate research**, 343, 7, pp 1222-1231.
66. Pattanayak M., Samanta S., Maity P., Manna D. K., Sen I. K., Nandi A. K., Panda B.C. and Sahoo A. K. (2016) "Polysaccharide of an edible truffle *Tuber rufum*: Structural studies and effects on human lymphocytes" **International J. of .biological macromolecules**, 95, PP 1037-1048.
67. Pereira M. I., Ruthes A. C., Carbonero E. R., Marcon R., Baggio C. H., Freitas C. S., Santos A. R., Eliasaro S. and Gorin P. A. J. (2010) "Chemical structure and selected biological properties of a glucomannan from the lichenized fungus *Heterodermiaobscurata*" **J. of .Phytochemistry**, 71, 17, pp 2132-2139.
68. Purdie T. and Irvin J. C. (1903) "Purdie methylation" **J. of .the Chemical Society**, 83, 1021.
69. Razavi S. M. A., Cui S. W. and Ding H. (2016) "Structural and physicochemical characteristics of a novel water-soluble gum from *Lallemantiaroyleana* seed" **InternationalJ. of .biological macromolecules**, 83, pp 142-151.
70. Razavi S. M. A., Cui S. W., Guo Q. and Ding H. (2014) "Some

physicochemical properties of sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum” **J. of Food Hydrocolloids**, 35, 453-462.

71. Rees D. A. (1977), “**Polysaccharide Shapes**”, John Wiley and Sons, New York.
72. Sahragard N. and Jahanbin K. (2017). “Structural elucidation of the main water-soluble polysaccharide from *Rubus anatolicus* roots” **J. of Carbohydrate polymers**, 175, pp 610-617.
73. Settineri W. J. and Marchessault R. H. (1965) “Derivation of possible chain conformations for poly -1→4-anyhydroxylose” **J. of Polymer Science, Part C**, 11, pp 253-264.
74. Shabani H., Askari G., Jahanbin K. and Khodaeian F. (2016) “Evaluation of physicochemical characteristics and antioxidant property of *Prunus avium* gum exudates” **International J. of biological macromolecules**, 93, pp 436-441.
75. Singthong J., Ningsanond S. and Cui S. W. (2009) “Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves” **J. of Food chemistry**, 114, 4, pp 1301-1307.
76. Singthong J., Cui S. W., Ningsanond S. and Goff H. D. (2004) “Structural characterization degree of esterification and some gelling properties of Krui Ma Noy, pectin” **J. of Carbohydrate Polymers**, 58, pp 391-400.
77. Sloneker J. H. and Whistler R. L. (1927), “**Gas-liquid chromatography of alditol acetates**” Academic Press, Inc.
78. Smiderle F. R., Carbonero E. R., Mellinger C. G., Sasaki G. L., Gorin P. A. and Iacomini M. (2006) “Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*” **J. of Phytochemistry**, 67, 19, pp 2189-2196.
79. Southgate D. A. T. (1991), “**Determination of Food Carbohydrates**”, Second Edition, Elsevier Applied Science, London.
80. Stahl G. (1969), “**Thin-layer chromatography**” a laboratory hand book, 2nd ed. [English translation]. New York: Springer-verlage.
81. Staub, A. (1965) “Removal of protein-Sevag method”, **Methods in carbohydrate chemistry**, 5(2), 5-6.
82. Sun L., Feng K., Jiang R., Chen J., Zhao Y., Ma R. and Tong H. (2010) “Water-soluble polysaccharide from *Bupleurum chinense* DC: Isolation, Structural features and antioxidant activity” **J. of Carbohydrate polymer**, 79, 1, pp 180-183.

83. Swallow K.W. and Low N. H. (1993) "Isolation and identification of Oligosaccharides in a commercial beet medium invert syrup" **J. of Agricultural. Food chemistry**, 41, pp 1587-1592.
84. Taylor R. L. and Conrad H. E. (1972) "Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups" **J. of Biochemistry**, 11, pp 1381-1388.
85. Tong H., Liang z. and Wang G. (2008) "Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the frute of physalisalkengi L." **J. of Carbohydrate Polymer**, 71, 2, pp180-183.
86. Vieira Í. G. P., Mendes F. N. P., Gallão M. I. and de Brito E. S. (2007) "NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (Prosopisjuliflora (Sw) DC)" **J. of Food chemistry**, 101, 1, pp70-73.
87. Walter R. H. (1998), "**polysaccharide dispersion:chemistry and technology in food**".Academic Press United States of America. PP 123-156.
88. Wang H., Wang Q., Wang S. C., Wang Z. T. and Shen J. F. (2006) "Extraction, isolation and structure identification of polysaccharide in root of Salvia miltiorrhiza" **J. of Chinese MateriaMedica**, 31, 13, pp 1075-1077.
89. Wrolstad R. E. (1993). Analysis of Suger in fruit products and juice, In:"**Proceeding of SPRI workshop on analysis of sugar and juice**",In foods September 30, New Orleans LA: Suger Processing Research Institute.
90. Wistler R. L. (1965), "**Methods in Carbohydrate Chemistry**", Vol. 5: General Polysaccharides. Academic Peress, New York.
91. Wu W., Zhu Y., Zhang L., Yang R. and Zhou Y. (2012) "Extraction, preliminary structural characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from Salvia miltiorrhiza Bunge" **J. of Carbohydrate Polymers**, 87(2), pp 1348-1353.
92. Yalpani M. (1988), "**Polysaccharides; Synthesis, Modifications and Structure/Property Relationships**" Elsevier, Amsterdam.
93. Yan, J. K., Wang, Y. Y., Ma H. L., Wang Z. B. and Pei J. J. (2016), "Structural characteristics and antioxidant activity in vivo of a polysaccharide isolated from Phellinus linteus mycelia" **J. of Taiwan Institute of Chemical Engineers**.
94. Zhang M., Wang G., Lai F. and Wu H. (2016) "Structural characterization and

immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii*” **J. of .agricultural and food chemistry**, 64, 9, pp 1921-1931

95. Zhu Z. y., Liu R. q., Si C.l., Zhou F., Wang Y. x., Ding L. n., Jing C., Liu L.N. and Zhang Y. m. (2011) “Structural analysis and anti-tumor activity comparison of polysaccharides from *Astragalus*” **J. of .Carbohydrate Polymers**, 85, 4, pp 895-902.
96. Zhu W., Xue X. and Zhang Z. (2016) “Ultrasonic-assisted extraction, structure and antitumor activity of polysaccharide from *Polygonummultiflorum*” **International J. of .biological macromolecules**, 91, pp 132-142.
97. Zimm B. H. (1948) “The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions” **J. of .Chemical Physics**, 16, pp 1093-1099.

Abstract

A new water-soluble polysaccharide with molecular weight of 95.8 K Da and a specific optical rotation of $+136.3^\circ$ was isolated from the roots of *salvia multicaulis* by extraction with warm water (70 C°) and purified by DEAE cellulose A 52 and Sephacryl S-400 HR columns, respectively. Total yields of crude and purified polysaccharide were 0.47% and 0.25%, respectively and the total carbohydrate content of purified polysaccharides was about 98.9%, as determined by the phenol- sulfuric acide method. Monosaccharide composition analysis indicated that purified polysaccharides composed of Xyl, Glc, Gal and GlcA in a molar ratio of 2.1: 2.9: 1.0: 1.2, respectively. The structural feature of purified polysaccharides was investigated by combination of optical rotation, partial acid hydrolysis, methylation analysis, periodic oxidation and smith degradation, Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) and nuclear magnetic resonance (NMR 1 D and 2 D) spectroscopy. The results obtained from the analyses indicated that main water -soluble polysaccharide of *salvia multicaulis* roots had a backbone consisting of (1 \rightarrow 4)-linked α -D-Glcp and (1 \rightarrow 4)-linked β -D-Xylp and side chains of (1 \rightarrow 6)-linked α -D-Galp, (1 \rightarrow)-linked α -D-GlcpA were attached to the backbone chian at C-6 position of (1 \rightarrow 6)-linked α -D-Glcp

Keywords: *Salvia multicaulis*, Polysaccharide, Extraction, Purification, Structure elucidation.



Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Food Industry

Isolation of a main water- soluble polysaccharide from
salvia multicaulis roots and its structural elucidation

By: Tayebeh Zare

Supervisor:

Dr. kambiz jahanbin

January 2018