

الله محمد



دانشکده کشاورزی

رشته مهندسی کشاورزی گرایش علوم مواد غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

شناسایی ساختار و بررسی خواص ضداکسندگی پلی ساکارید غالب

ریشه شکر تیغال (*Echinops cephalotes* DC)

نگارنده: سیما رضازاده

استاد راهنما:

دکتر کامبیز جهان بین

خرداد ماه ۱۳۹۸

تعهدنامه

اینجانب سیما رضازاده دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی علوم مواد غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه شناسایی ساختار و بررسی خواص ضدآکسندگی پلی ساکارید غالب ریشه شکر تیغال (*Echinops cephalotes* DC) 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 پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالعه 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 بافت های آن ها) 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 اخلاقی انسانی رعایت شده است.

تاریخ

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.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

تقدیم به مادر عزیزتر از جانم:

مادم، هستی من ز، هستی توست تا، هستم و هستی دارم دوست

نگسار جاودانی مادراست

چشمه سار مهربانی مادراست

و تقدیم بابوسه بردستان پدرم:

به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا مردانگی، سخاوت، سکوت، مهربانی و..

پدرم راه تمام زندگیست

پدرم دین خوشی، بی شکست

تشکر و قدردانی:

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم.

با سپاس فراوان از راهنمائی ها و زحمات استاد محترم و گرانقدر جناب آقای دکتر کامبیز جهان بین که از ابتدای راه و در طی انجام این تحقیق با راهنمائی های خود مرا در نگارش این اثر یاری نمودند.

و از اساتید محترم، جناب آقای دکتر احمد رجایی و دکتر حمیدرضا صمدلویی که زحمت داوری این اثر را برعهده گرفته اند.

یاد و خاطره خواهرانم و همه دوستان به خصوص دوستان خوابگاهیم را گرامی می دارم و از خداوند منان برای آن ها موفقیت و کامیابی در تمامی مراحل زندگیشان خواستارم.

چکیده

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی با وزن مولکولی $82/4$ کیلودالتون و درجه چرخش نوری $19/5^\circ$ + توسط استخراج با آب داغ (80°C) از ریشه های گیاه شکر تیغال سفالوتس استخراج شد. خالص سازی پلی ساکارید توسط ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس جی-100 انجام گرفت. میزان قند کل پلی ساکارید خالص $96/9\%$ تعیین شد و پلی ساکارید فاقد پروتئین و اسید نوکلئیک بود. نتایج آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید با دستگاه کروماتوگرافی گازی نشان داد که پلی ساکارید ریشه گیاه شکر تیغال سفالوتس از واحدهای مونومری گلوکز، آرابینوز، زایلوز و رامنوز به ترتیب با نسبت های مولی $4/12$ ، $0/98$ ، $1/06$ و $1/00$ ($1:1:1:4$) تشکیل شده است. شناسایی ساختار پلی ساکارید توسط تلفیقی از روش های شیمیایی و دستگاهی مانند متیلاسیون، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریدوات و تجزیه اسمیت، طیف مادون قرمز و طیف رزونانس مغناطیس هسته اتم های کربن و پروتون تک و دو بعدی صورت گرفت و نتایج حاصل نشان داد که واحدهای بتا-د-گلوکوپیرانوز با اتصالات $1 \rightarrow 6$ ، $6 \rightarrow 4$ و $1 \rightarrow 3$ و $6 \rightarrow 3$ اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص را تشکیل می دهند و در محل کربن شماره 3 بتا-د-گلوکوپیرانوز ($1 \rightarrow 3$) و $6 \rightarrow 3$ یک شاخه جانبی متشکل از آلفا-ال-آرابینوفورانوز ($1 \rightarrow 3$) و بتا-د-زایلوپیرانوز ($1 \rightarrow 1$) و در محل کربن شماره 4 بتا-د-گلوکوپیرانوز ($1 \rightarrow 4$) و $6 \rightarrow 4$ شاخه جانبی دیگر از آلفا-ال-رامنوپیرانوز ($1 \rightarrow 1$) قرار گرفته است. با استفاده از خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH خاصیت ضد اکسندگی این پلی ساکارید مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این خاصیت وابسته به غلظت است و در غلظت های مشابه نسبت به اسید آسکوربیک کمتر بود.

کلمات کلیدی: پلی ساکارید، استخراج و خالص سازی، تعیین ساختار، شکر تیغال سفالوتس، فعالیت ضد اکسندگی

فهرست مطالب

1	فصل اول مقدمه و کلیات
4-1-1	کربوهیدرات ها
8-2-1	طبقه بندی کربوهیدرات ها
8-1-2-1	مونوساکاریدها
10-2-2-1	الیگوساکاریدها
11-3-2-1	پلی ساکاریدها
11-4-2-1	دلایل اهمیت پلی ساکاریدها
12-3-1	ساختار عمومی و طبقه بندی پلی ساکاریدها
16-1-3-1	منابع دریایی پلی ساکاریدها
17-2-3-1	منابع حیوانی پلی ساکاریدها
18-3-3-1	منابع میکروبی پلی ساکاریدها
19-4-3-1	منابع گیاهی پلی ساکاریدها
21-4-1	استخراج
22-1-4-1	استخراج و حلالیت پلی ساکاریدها
22-2-4-1	روش های جداسازی و استخراج پلی ساکاریدها
25-5-1	خالص سازی و شناسایی ساختار پلی ساکاریدها
28-1-5-1	روش های شیمیایی
28-1-5-1-1	تعیین وزن مولکولی
31-1-5-1-2	تعیین مونوساکاریدهای سازنده
32-1-5-1-2-1	کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)
33-1-5-1-2-2	کروماتوگرافی گازی (GC)
34-1-5-1-3	تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی
35-1-5-1-3-1	متیلاسیون

- 37..... 1-5-1-3-2 هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)
- 38..... 1-5-1-3-3 اکسایش پرپودات و تجزیه اسمیت
- 39..... 1-5-1-3-4 درجه چرخش نوری پلاریمتری
- 40..... 2-5-1-2 روش های آنزیمی
- 41..... 1-5-3-1 روش های طیف سنجی
- 41..... 1-5-3-2 طیف سنج فرابنفش - مرئی
- 42..... 1-5-3-3 طیف سنج مادون قرمز (IR)
- 44..... 4-3-5-1 طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای
- 47..... 6-1 بررسی خاصیت ضد اکسندگی
- 48..... 7-1 گیاه شکر تیغال
- 49..... 1-7-1 اثرات درمانی شکر تیغال
- 50..... 1-7-2 سمیت شکر تیغال
- 51..... فصل دوم بررسی منابع
- 52..... 1-2 استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها
- 56..... 2-2 شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها
- 66..... فصل سوم مواد و روش ها
- 67..... 3-1 مواد اولیه و محلول های شیمیایی
- 67..... 3-1-1 جمع آوری نمونه
- 68..... 3-1-2 مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده
- 69..... 3-1-3 دستگاه های مورد استفاده
- 70..... 3-2 روش کار
- 3-2-1 استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه های گیاه شکر تیغال
- 70..... سفالوتس
- 70..... 1-1-2-3 حذف ترکیبات رنگی
- 71..... 2-1-2-3 استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه شکر تیغال سفالوتس

72	3-1-2-3- خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب از ریشه گیاه شکر تیغال سفالوتس
75	3-2-3- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکارید محلول در آب
75	1-3-2-3- طیف فرابنفش پلی ساکارید خالص
75	2-3-2-3- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید
76	3-3-2-3- اندازه گیری درجه چرخش نوری
76	4-3-2-3- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید
78	5-3-2-3- بررسی طیف مادون قرمز پلی ساکارید
78	6-3-2-3- هیدرولیز ناقص اسیدی
79	7-3-2-3- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت
79	8-3-2-3- متیله کردن پلی ساکارید خالص
79	9-3-2-3- طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR)
80	10-3-2-3- بررسی خاصیت ضد اکسندگی
81	فصل چهارم نتایج و بحث
82	4-1- جداسازی پلی ساکارید ریشه گیاه شکر تیغال سفالوتس
84	4-2- شناسایی همگنی و تعیین وزن مولکولی
85	4-3- محاسبه درجه چرخش نوری
85	4-4- مقدار قند کل و شناسایی واحدهای سازنده پلی ساکارید کاملاً خالص
87	4-5- طیف مادون قرمز پلی ساکارید کاملاً خالص
89	4-6- هیدرولیز ناقص اسیدی
90	4-7- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت
91	4-8- متیله کردن پلی ساکارید کاملاً خالص
93	4-9- NMR پلی ساکارید کاملاً خالص
103	4-10- فعالیت ضد اکسندگی رادیکال DPPH
103	نتیجه گیری کلی
105	فصل پنجم منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: طرح های مختلف نمایش D گلوکز..... ۹
- شکل ۲-۱: ترکیب تعدادی از الیگوساکاریدهای مهم موجود در مواد غذایی..... ۱۰
- شکل ۳-۱: مونوساکاریدهای رایج در ساختار پلی ساکاریدها..... ۱۴
- شکل ۴-۱: زایلوگلوکان و آرابینوزایلان..... ۲۰
- شکل ۵-۱: مکانیسم کروماتوگرافی تبادل یونی..... ۲۷
- شکل ۶-۱: نمایش چهار نوع وزن مولکولی..... ۲۹
- شکل ۷-۱: اجزای اصلی دستگاه HPLC..... ۳۲
- شکل ۸-۱: شمای دستگاه کروماتوگرافی گازی..... ۳۴
- شکل ۹-۱: مراحل آنالیز متیلاسیون..... ۳۶
- شکل ۱۰-۱: اکسایش پرپودات..... ۳۹
- شکل ۱۱-۱: واکنش آنزیمی هگزوکیناز..... ۴۱
- شکل ۱۲-۱: جابجایی شیمیایی پروتون در کربوهیدرات ها..... ۴۵
- شکل ۱۳-۱: جابجایی شیمیایی کربن در کربوهیدرات ها..... ۴۶
- شکل ۱۴-۱: شکر تیغال سفالوتس..... ۴۹
- شکل ۱-۲: واحدهای سازنده پلی ساکارید ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری..... ۵۷
- شکل ۲-۲: واحدهای سازنده پلی ساکارید ساقه گیاه اکتوپانکس لوکورایزس..... ۵۷
- شکل ۳-۲: واحدهای سازنده CBBP-3 گیاه سرخس پشمین..... ۵۹
- شکل ۴-۲: واحدهای سازنده CBBP-2 گیاه سرخس پشمین..... ۵۹
- شکل ۵-۲: ساختار پلی ساکارید ریشه گیاه تمشک برگ نارونی..... ۶۰
- شکل ۶-۲: ساختار پلی ساکارید ریشه گیاه سریش استنوفیلوس بیکر..... ۶۱
- شکل ۷-۲: ساختار پلی ساکارید بذر درمنه..... ۶۳
- شکل ۸-۲: ساختار پلی ساکارید قارچ شیتاکه..... ۶۳

- شکل ۳-۱: گیاه شکر تیغال سفالوتس. ۶۷.....
- شکل ۳-۲: ریشه های خرد شده و ریز شکر تیغال سفالوتس. ۶۸.....
- شکل ۴-۱: پلی ساکارید خالص (راست) و ناخالص (چپ). ۸۲.....
- شکل ۴-۲: کروماتوگرام فراکشن های شسته شده با ستون جی-۱۰۰ (A) و HPGPC (B). ۸۳.....
- شکل ۴-۳: کروماتوگرام گازی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید شکر تیغال سفالوتس. ۸۶.....
- شکل ۴-۴: طیف مادون قرمز پلی ساکارید کاملاً خالص. ۸۸.....
- شکل ۴-۵: طیف NMR پروتون (A) و کربن-13 (B) پلی ساکارید خالص. ۹۴.....
- شکل ۴-۶: طیف $H-^1HCO\text{S}Y$ پلی ساکارید خالص. ۹۶.....
- شکل ۴-۷: طیف $H-^{13}C\text{ HM}QC$ پلی ساکارید خالص. ۹۷.....
- شکل ۴-۸: طیف $HMBC$ پلی ساکارید خالص. ۱۰۰.....
- شکل ۴-۹: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص ریشه های شکر تیغال سفالوتس. ۱۰۱.....
- شکل ۴-۱۰: اثر مهارکنندگی پلی ساکارید خالص روی رادیکال های DPPH. ۱۰۲.....

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: مقدار کربن حاصل از مواد بیوشیمیایی موجود در گیاهان و انرژی حاصل از آن ها ۶
- جدول ۱-۲: کربوهیدرات ها در تعدادی از غذاها و محصولات غذایی ۶
- جدول ۱-۳: نام های رایج و سیستماتیک برخی از قندها ۹
- جدول ۱-۴: طبقه بندی پلی ساکاریدها با توجه به نوع توالی واحدهای قندی در زنجیرهای کربوهیدرات ۱۵
- جدول ۱-۵: روش های استخراج پلی ساکاریدها از دیواره سلولی گیاهی (میوه و سبزیجات) ۲۳
- جدول ۱-۶: انواع ماتریکس ژل کروماتوگرافی ۲۶
- جدول ۱-۷: روش های به دست آوردن انواع وزن مولکولی ۳۰
- جدول ۴-۱: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی ۸۹
- جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت ۹۱
- جدول ۴-۳: نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید کاملاً خالص متیله شده ۹۲
- جدول ۴-۴: مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون و کربن پلی ساکارید خالص ۹۸

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه

کربوهیدرات ها در بافت های گیاهی، جانوری و همچنین میکروارگانیسم ها در شکل ها و مقادیر بسیار متفاوت وجود دارند. ترکیبات عمده سازنده مواد غذایی هستند و بیش از 90٪ ماده خشک میوه ها، سبزیجات و 70 تا 80٪ کالری دریافتی بدن را به خود اختصاص می دهند (Demam, 1999; Bemiller *et al.*, 2008).

تاریخچه استفاده از گیاهان و ترکیبات زیست فعال گیاهی به سال های دور برمی گردد. از طب گیاهی سالیان طولانی برای درمان بیماری های مختلف انسان و حیوان استفاده شده است. شیوع کم بیماری های غیرعفونی در دوره پیش مدرن، وجود ادعاهای تغذیه ای و برخی ادعاهای مبنی بر اثر بعضی ترکیبات در پیشگیری و درمان بعضی بیماری ها، توجه محققین را به استخراج ترکیبات زیست فعال گیاهی جلب کرده است (باقری و همکاران، ۱۳۹۱).

تمایل مردم جهان برای مصرف محصولات گیاهی در سال های اخیر بسیار چشمگیر بوده است بطوریکه در سال ۲۰۰۰ مبادله ی مالی گیاهان دارویی در جهان حدود ۲۰ میلیارد دلار گزارش شد و به پیش بینی (سازمان بهداشت جهانی)^۱، این رقم در سال ۲۰۵۰ به ۵۰ میلیارد دلار هم خواهد رسید. مطابق آخرین گزارشات این سازمان، حدود ۸۰٪ جمعیت دنیا مصرف کننده ی محصولات گیاهی هستند (خانوی و همکاران، ۱۳۸۹).

از مجموع ۱۷۰۰ گونه ی دارویی و صنعتی شناخته شده در کشور، حدود ۲۰۰ الی ۳۰۰ گونه مورد بهره برداری قرار می گیرند و سایر گونه ها به علت عدم شناخت کافی به دلایل گوناگونی از بین می روند بدون آنکه کوچک ترین استفاده از این سرمایه ی بیکران خدادادی صورت پذیرد (عماد، ۱۳۷۹).

میزان تولید گیاهان دارویی (فضای باز) در سال ۱۳۹۵، ۱۵۲۵۹۹ تن بوده که در سال ۱۳۹۶ به ۱۹۷۷۹۲ تن رسید و برابر ۲۹/۶ درصد رشد داشته است (بی نام، ۱۳۹۶).

¹ World Health Organization (WHO)

استفاده از گیاهان، میکروارگانیسم ها، جلبک ها و حیوانات برای درمان بیماری های انسانی از ظرفیت بیوسنتز ذاتی آن ها در تولید طیف گسترده ای از مولکول های فعال زیستی طبیعی قدرتمند ناشی می شود. مولکول های فعال زیستی گیاهی می توانند به عنوان داروهای انسانی استفاده شوند یا می توان تغییرات شیمیایی برای تعدیل کردن فعالیت های درمانی روی آن ها انجام داد (فاضلی، 1395).

پلی ساکاریدها¹ نقش مهمی به عنوان جاذب رادیکال های آزاد و در نتیجه پیشگیری از آسیب اکسیداسیونی در موجودات زنده ایفا می کنند (Yang et al., 2009; Hu et al., 2001). ضد اکسنده های طبیعی بیش از ضد اکسنده های سنتزی توسط اکثر مصرف کنندگان ترجیح داده می شوند. ضد اکسنده های طبیعی به طور عمده قدرت ضد اکسندگی کمتری دارند، اما با هدف تعیین فعالیت ضد اکسندگی واقعی تحت شرایط یکسان یا بسیار نزدیک به کاربردهای واقعی، توصیه می شوند. ارگانیسم ها به عنوان موجوداتی که به فراوانی دارای ترکیبات ضد اکسندگی هستند، در از بین بردن گونه های اکسیژن فعال (ROSها)² مانند سوپراکسید، آنیون ها، پراکسید هیدروژن و رادیکال های هیدروکسیل از بدن مؤثرند (فاضلی، 1395).

شکر تیغال از گیاهان دارویی با ارزش است که از قدیم الایام از بعضی گونه های آن برای مداوای بیماری های پوستی، بند آوردن خون، درمان آبسه، جوش و دمل، رفع التهاب حفرات بینی (آئینه چی، 1370)، درمان تشنج، سرما خوردگی (زرگری، 1370) و چشم درد استفاده شده است (میر حیدر، 1373).

گونه های این جنس، از گیاهان با ارزش در تولید عسل به شمار می آیند و به طور معمول در زمان گلدهی، زنبورداران کندوهای خود را به رویشگاه های این گیاه می برند و کیفیت عسل حاصل نیز بسیار مرغوب می باشد (Chaudhuri, 1988). میوه آن دارای آلکالوئید شکر تیغالین می باشد که اثر مثبتی روی تقویت حافظه و قدرت یادگیری دارد (آئینه چی، 1370).

¹ Polysaccharides

² Reactive oxygen species

شکر تیغال از لحاظ شیمیایی حائز اهمیت فراوان است و تاکنون طی پژوهش‌های به عمل آمده، ده‌ها نوع آلکالوئید از اندام‌های مختلف آن استخراج شده که در صنعت، کشاورزی و پزشکی کاربرد دارند (Change *et al.*, 1990). گونه گیاهی سفالوتس (*cephalotes* DC) از جنس شکر تیغال و خانواده آفتابگردان می‌باشد (قهرمان، 1361). در حال حاضر میزان استفاده از پلی‌ساکاریدهای تجدیدپذیر و سازگار با محیط زیست در مواد غذایی فراوری شده حدود ۱۰٪ از کل میزان مصرف آن‌هاست و با توجه به اینکه عمده پلی‌ساکاریدهایی که در صنعت مواد غذایی استفاده می‌شوند از منابع گیاهی و نیز جلبک‌ها هستند، تعیین ساختار پلی‌ساکاریدها و تعیین ویژگی‌های عملکردی آن‌ها، امکان استفاده از این ترکیبات را در بخش گسترده‌ای از صنعت از جمله صنایع غذایی فراهم می‌کند (ذوقی، ۱۳۹۵). تا کنون در خصوص پلی‌ساکاریدهای محلول در آب و ویژگی‌های عملکردی شکر تیغال سفالوتس تحقیقاتی صورت نگرفته است لذا انجام هرگونه مطالعه پیرامون ویژگی‌ها و ساختار آن از اهمیت زیادی برخوردار است. بنابراین در پایان نامه پیش رو استخراج، خالص‌سازی و شناسایی ساختار پلی‌ساکارید غالب محلول در آب گیاه شکر تیغال سفالوتس انجام گرفت و خاصیت ضد اکسندگی آن نیز بررسی شده است. به این امید که نتایج این پایان‌نامه بتواند راه‌مطالعات آتی را برای پژوهشگران و دست‌اندرکاران رشته‌های صنایع غذایی، داروسازی، پلیمر، پزشکی، منابع طبیعی و ... هموار کند.

1-1- کربوهیدرات‌ها^۱

کربوهیدرات‌ها از نظر کیفیت مواد غذایی، کاربردهای متفاوتی دارند. قندها منابع عمده شیرینی هستند. اگرچه از کربوهیدرات‌ها به عنوان ترکیبات فاقد بو یاد می‌شود، اما ترکیبات فرار حاصل از واکنش‌های میلارد^۲، تجزیه استرکر^۳ و واکنش‌های کاراملی شدن می‌توانند ترکیبات معطر و طعم‌زای مطلوب، نامطلوب یا خنثی تولید کنند.

¹ Carbohydrate

² Maillard

³ Strecker degradation

همچنین اگرچه کربوهیدرات‌ها فاقد رنگ هستند، اما برای تولید رنگ‌های قهوه‌ای مطلوب یا نامطلوب در واکنش میلارد و کاراملی شدن شرکت می‌کنند. سلولز، همی سلولز، پکتین و نشاسته، کربوهیدرات‌های ساختاری در گیاهان هستند که تا حد زیادی مسئول ویژگی‌های بافتی میوه‌ها و سبزیجات هستند. نشاسته و مشتقات آن و هیدروکلئیدهای مختلف جدا شده از گیاهان، جلبک‌ها و منابع میکروبی به عنوان عوامل تغلیظ‌کننده، تولیدکننده ژل، ایجاد بافت و پایدارکننده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مصرف انواع مختلفی از کربوهیدرات‌های پیچیده می‌تواند خطر بیماری‌های دیابت، گرفتگی عروق کرونری قلب، دایورتیکولیتوس¹ و سرطان روده را کاهش دهد. توصیه متخصصین تغذیه برای دستیابی به بیشترین عملکرد جسمانی بر مصرف کربوهیدرات‌های مناسب در مقدار مناسب و زمان مناسب تأکید دارد (Walker et al., 2009).

کربوهیدرات‌ها با فرمول عمومی $C_n(H_2O)_m$ تعریف شده‌اند که تک‌قندی‌ها مانند گلوکز، فروکتوز ($n=m=6$)، دو قندی‌ها مانند ساکارز ($n=12, m=11$) و چندقندی‌ها ($m=n-1$) با این فرمول مطابقت دارند. امروزه کربوهیدرات‌ها را پلی‌هیدروکسی آلدئید یا پلی‌هیدروکسی کتون می‌نامند (Sinnott, 2007).

گلیکوژن، کربوهیدرات ذخیره‌ای حیوانی است. در ارگان‌های گیاهی انواع بسیار زیادی از مونوساکاریدها² و الیگوساکاریدها³ وجود دارند و نشاسته کربوهیدرات ذخیره‌ای می‌باشد (Deman, 1999). یکی از راه‌های ذخیره انرژی گیاهان، کربوهیدرات‌های ساختاری به ویژه سلولز است که در ترکیب با لیگنین می‌باشد (Blanshard et al., 2013). مقدار کربن و انرژی مواد بیوشیمیایی گیاهان در جدول 1-1 آورده شده است.

ساخت برخی کربوهیدرات‌ها توسط گیاهان از طریق واکنش‌های نوری (فتوسنتز) انجام می‌شود. این ترکیبات که در تمام گیاهان وجود دارند حاصل ترکیب دی‌اکسید کربن و آب هستند. برای تبدیل دی‌اکسید کربن و آب

¹ Diverticulitis (التهاب در کیسه‌هایی که در نقطه‌ای ضعیف از دیواره یک مجرا در بدن ایجاد می‌شوند. به ویژه در روده بزرگ که باعث بروز درد و نقض در عملکرد روده می‌شود)

² Monosaccharides

³ Oligosaccharides

به کربوهیدرات ها، انرژی مورد نیاز است که توسط نور خورشید تامین شده و به صورت انرژی شیمیایی ذخیره می شود (زندى، 1375). کربوهیدرات های برخی از فراورده های غذایی در جدول 1-2 ارائه شده است.

جدول 1-1: مقدار کربن حاصل از مواد بیوشیمیایی موجود در گیاهان و انرژی حاصل از آن ها (Blanshard *et al.*, 2013).

KJ/Kg	مقدار کربن (%)	
15600	40	مونوساکاریدها
16700	42	دی ساکاریدها
17600	44	پلی ساکاریدها
25100	63	لیگنین
39700	75	چربی

جدول 2-1: کربوهیدرات ها در تعدادی از غذاها و محصولات غذایی (Deman, 1999).

پلی ساکاریدها	مونو و دی ساکاریدها (%)	کل قند (%)	فراورده
نشاسته 1/5؛ سلولز 1	مقدار ناچیز؛ ساکارز 3/78؛	14/5	سیب
	مانوز		
سلولز 0/6	مانوز 2/19؛ ساکارز 1/3؛	17/3	انگور
سلولز 1/3	مانوز 0/07؛ ساکارز 2/40؛	8/4	توت فرنگی
نشاسته 7/8؛ سلولز 1	ساکارز 4/25؛	9/7	هویج
	مانوز 0/85؛ فروکتوز 0/85؛		

سلولز 0/71	گلوکز 2/07؛ فروکتوز 1/09؛ ساکارز 0/89	8/7	پیاز
سلولز 2/4	ساکارز 4-12	18/6	بادام زمینی
نشاسته 14؛ سلولز 0/5		17/1	سیب زمینی
سلولز 0/7؛ سلولز 60	ساکارز 17-12	22/1	ذرت شیرین
نشاسته 14/65؛ سلولز 0/7	گلوکز 0/87؛ ساکارز 3-2	26/3	سیب زمینی شیرین
	گلوکز 28-35؛ فروکتوز 34-41؛ ساکارز 5-1	82/3	عسل
	ساکارز 58/2-65/5؛ هگزوزها 0-7/9	65/5	شربت افرا
گلیکوژن 0/10	گلوکز 0/01		گوشت
	لاکتوز 4/9	4/9	شیر
	ساکارز 20-18	18-20	چغندر قند
	گلوکز + فروکتوز 4-8؛ ساکارز 10-20	14-28	عصاره نیشکر

1-2- طبقة بندی کربوهیدرات ها

کربوهیدرات ها پلی هیدروکسی کربونیل هایی هستند که به شکل تک واحدی مانند مونوساکاریدها یا چند واحدی مانند دی ساکاریدها، تری ساکاریدها، تتراساکاریدها، الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها تقسیم بندی می شوند (Wrolstad, 2012).

1-2-1- مونوساکاریدها

مونوساکاریدها که قندهای ساده نیز نامیده می شوند به دو شکل آلدوز¹ و کتوز² وجود دارند که گلوکز و فروکتوز از رایج ترین اشکال آن ها هستند. آلدوزها دارای یک گروه عاملی آلدهیدی روی کربن شماره 1 (C-1) هستند در حالی که کتوزها، یک گروه کتونی روی کربن شماره 2 (C-2) خود دارند. یک روش سیستماتیک برای نام گذاری قندها وجود دارد که چند مثال در جدول 1-3 بیان شده است. ساختمان قندها را می توان با چهار طرح فیشر³، هاورث⁴، میلز⁵ و کنفورماسیون⁶ نمایش داد (Wrolstad, 2012). طرح های مختلف نمایش D گلوکز در شکل 1-1 نمایش داده شده است.

¹ Aldose

² Ketose

³ Fisher

⁴ Haworth

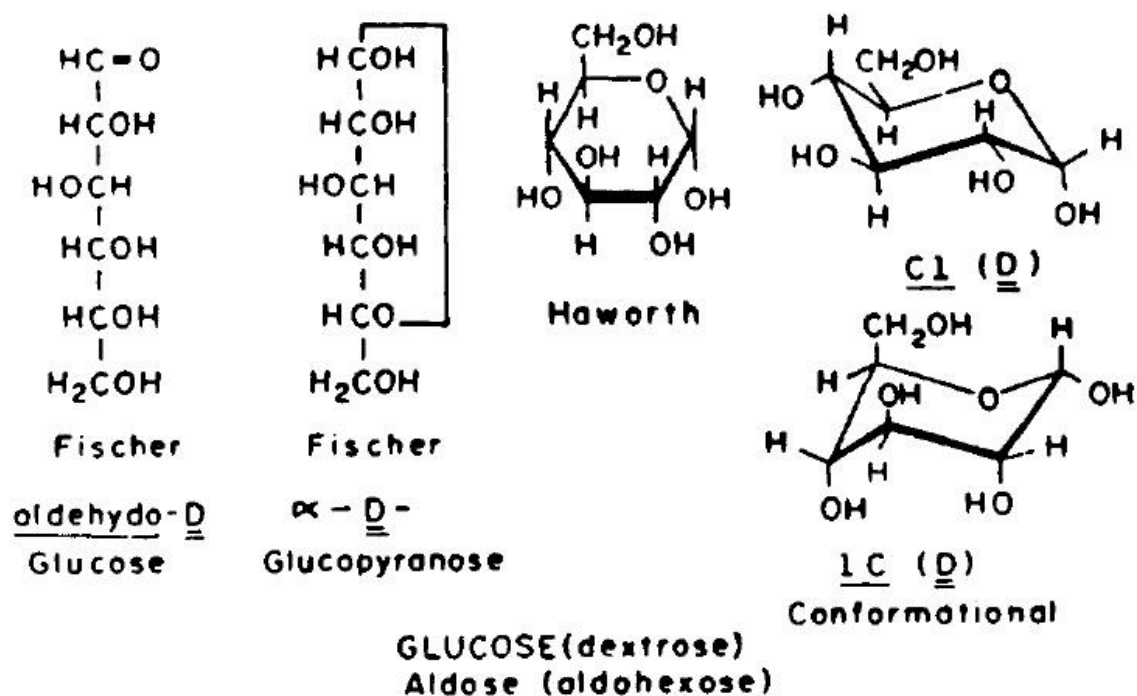
⁵ Mills

⁶ Conformational

جدول 1-3: نام های رایج و سیستماتیک برخی از قندها (Wrolstad, 2012).

Trivial (or Common)	Systematic ^a
D-Erythrose	D-erythro-tetrose
D-Threose	D-threo-tetrose
D-Arabinose	D-arabino-pentose
D-Lyxose	D-lyxo-pentose
D-Ribose	D-ribo-pentose
D-Xylose	D-xylo-pentose
D-Allose	D-allo-hexose
D-Altrose	D-altro-hexose
D-Galactose	D-galacto-hexose
D-Glucose	D-gluco-hexose
D-Gulose	D-gulo-hexose
D-Idose	D-ido-hexose
D-Mannose	D-manno-hexose
D-Talose	D-talo-hexose

a در نام گذاری علمی، پیشوند ساختمانی هر قند با کلمات ایتالیایی نوشته شده و نام بعد از کلمات ایتالیایی، نشان دهنده تعداد کربن در هر مولکول است.

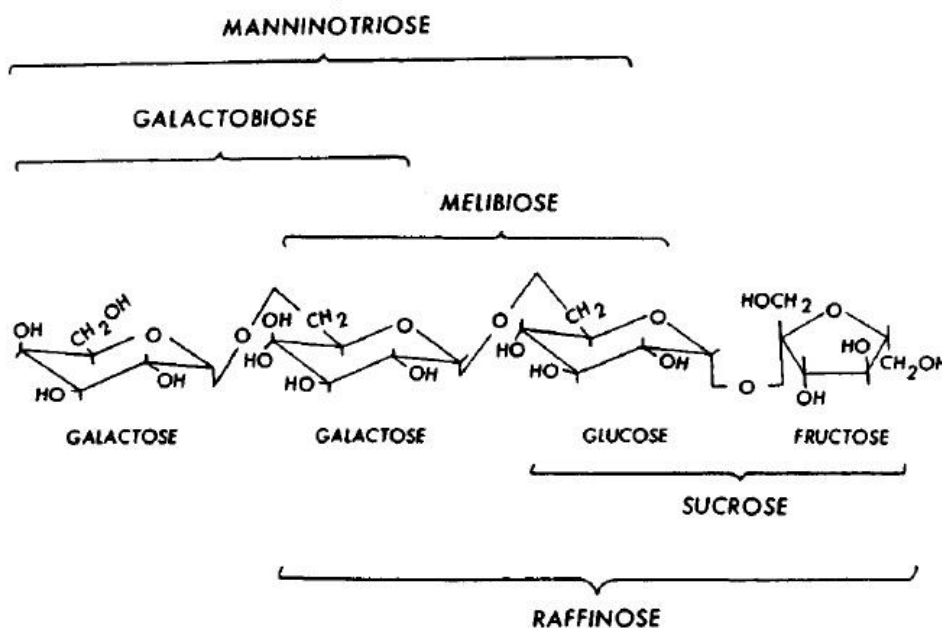


شکل 1-1: طرح های مختلف نمایش D گلوکز (Wolf, 1969).

1-2-2- الیگوساکاریدها

وقتی تعداد واحدهای مونوساکارید در یک زنجیر گلیکوزیدی بین 10-2 عدد باشد ترکیب حاصل یک الیگوساکارید خواهد بود. الیگوساکاریدها از مونوساکاریدهای D گلوکز، D گالاکتوز، D فروکتوز و ... تشکیل شده اند (Demam, 1999). برحسب تعداد مونوساکارید سازنده ی مولکول می توان دی ساکارید، تری ساکارید، تتراساکارید و غیره را نام برد. دی ساکاریدها از فراوان ترین الیگوساکاریدها در طبیعت هستند که بر اثر هیدرولیز (آبکافت) آن ها دو مولکول مونوساکارید به وجود می آید (ربانی چادگانی، 1372).

ترکیب تعدادی از الیگوساکاریدهای مهم موجود در مواد غذایی در شکل 1-2 ارائه شده است. دی ساکاریدها (2 واحد قندی) از واکنش یک اتم کربن آنومری با گروه هیدروکسیل یک قند دیگر ایجاد می شوند. این اتصال استالی یا کتالی، اتصال گلیکوزیدی¹ نیز نامیده می شود (Wrolstad, 2012).



شکل 1-2: ترکیب تعدادی از الیگوساکاریدهای مهم موجود در مواد غذایی (Demam, 1999).

¹ Glycosidic linkage

1-2-3- پلی ساکاریدها

ترکیبات بزرگ مولکولی هستند که از به هم پیوستن واحدهای مونوساکاریدی (بیش از 10 واحد) ساخته می شوند. پلی ساکاریدها به طور طبیعی در موجودات زنده به صورت مواد ساختاری یا مواد ذخیره ای وجود دارند. در اثر آبکافت اسیدی یا آنزیمی پلی ساکاریدها، پلی ساکاریدهای کوچک تا الیگوساکاریدها و مونوساکاریدها به وجود می آیند. اگر مونوساکاریدهای سازنده ی پلی ساکارید از یک نوع باشند، پلی ساکارید را هوموپلی ساکارید و اگر از انواع مختلف باشند هتروپلی ساکارید می نامند (ربانی چادگانی، 1372).

1-2-4- دلایل اهمیت پلی ساکاریدها

در سال های اخیر، استفاده از پلی ساکاریدهای گیاهی شامل (صمغ ها، موسیلاژها و هیدروکلوئیدها) در صنایع غذایی و دارویی به سرعت در حال توسعه است. این ترکیبات می توانند به عنوان عوامل درمانی، عوامل جانبی، پرکننده و پایدارکننده، امولسیفایر، کپسوله کننده و همچنین پوشش دهنده و اصلاح بافت مورد استفاده قرار گیرند. تحقیقات در رابطه با تعیین ساختار، اصلاحات مولکولی و فعالیت های بیویستی گوناگون پلی ساکاریدها افزایش یافته است. پلی ساکاریدها به عنوان یک ماده مطلوب غالباً به طور وسیع در صنایع غذایی به کار می روند و به دلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاصشان اهمیت فراوانی در جهت توسعه کاربردی بر اساس ویژگی هایشان پیدا کرده اند (Guo *et al.*, 2016).

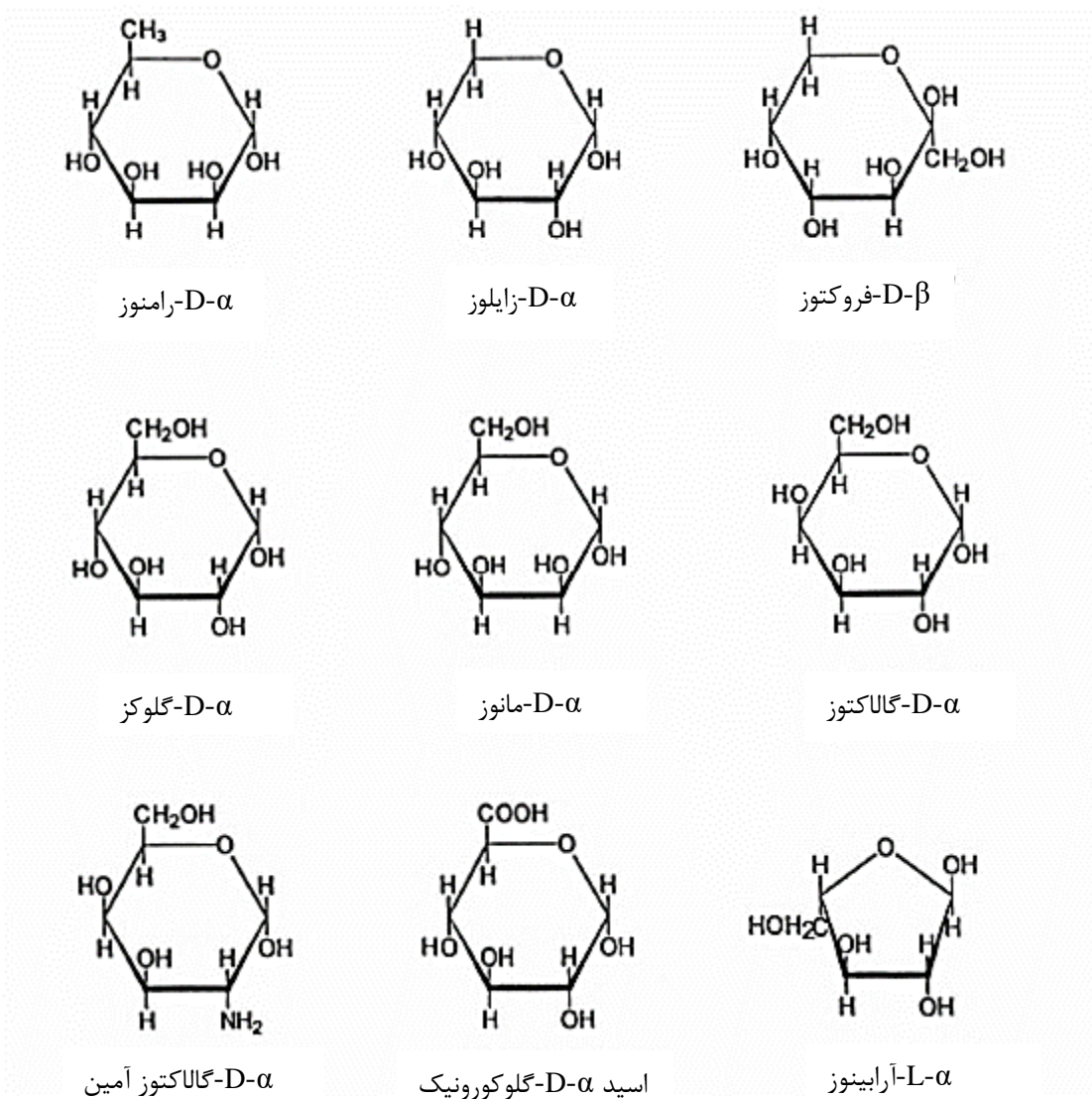
فعالیت بیولوژیکی پلی ساکاریدها به میزان زیادی تحت تاثیر ساختار آن ها قرار می گیرد. به دلیل مشکلات مربوط به شناسایی ساختار شیمیایی پلی ساکاریدها، درک ارتباط بین ساختار و فعالیت بیولوژیکی آن ها به طور کامل

امکان پذیر نیست (Jiao *et al.*, 2011). پلی ساکاریدها با عملکرد بیولوژیکی مختلف از لحاظ ساختار، ترکیب شیمیایی، نحوه قرارگیری زنجیرها، نوع ایزومری و خصوصیات فیزیکی با هم تفاوت دارند (Jin *et al.*, 2011). مطالعات انجام شده در زمینه بررسی ارتباط وزن مولکولی پلی ساکاریدهای گیاهی و خواص بیولوژیکی آن ها نشان می دهد که بخش های دارای وزن مولکولی بیشتر محافظت در برابر اشعه را بیشتر از ترکیب با وزن مولکولی کمتر انجام می دهد. در واقع وزن مولکولی بیشتر، نقش حیاتی در حفظ موقعیت فضایی و پیکربندی مولکول ایفا می کند. پلی ساکاریدها می توانند حاوی اطلاعات بیولوژیکی باشند به علت اینکه پلی ساکاریدها شامل انواعی از قندهای ضروری مانند گلوکز، مانوز و زایلوز هستند که در گلیکوپروتئین های انسانی و گیرنده های گلیکوپروتئینی فراوان هستند. نتایج مطالعات نشان می دهد که وجود اسیدهای ارونیک می تواند خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حالیت پلی ساکاریدها را تغییر دهد. همچنین گزارش شده بخش هایی از پلی ساکاریدها که غنی از اسیدهای ارونیک هستند فعالیت بیولوژیکی دارند. همچنین مقدار زیاد اسید گالاکتورونیک در پلی ساکاریدها، در عملکرد ضد اکسندگی آن ها موثر بوده است. نتایج برخی مطالعات نشان داده است که بخش های غنی از اسیدهای ارونیک قادر به تقویت سیستم ایمنی بدن هستند. بعضی پلی ساکاریدهای استخراج شده از منابع گیاهی دارای خاصیت ضد توموری قابل توجه و فعالیت تقویت سیستم ایمنی هستند. بیشتر مطالعات انجام شده نشان داده اند خصوصیات زیست فعالی پلی ساکاریدها به طور دقیق مرتبط با ترکیب شیمیایی، وزن مولکولی و همچنین خصوصیات فیزیکی آن هاست (Jin *et al.*, 2012).

1-3- ساختار عمومی و طبقه بندی پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدها یا گلیکان ها از چند ده یا هزار واحد مونوساکاریدی مختلف متصل به هم با پیوندهای گلیکوزیدی مختلف (آلفا یا بتا 1→4، 1→6، 1→3 و غیره) تشکیل یافته اند. پلی ساکاریدها به علت داشتن ساختارهای متفاوت، فعالیت های بیولوژیکی مختلف نشان می دهند. حتی پلی ساکاریدهای موجود در یک منبع با توجه به ویژگی های فیزیکوشیمیایی متنوع، عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی دارند. به همین علت شناسایی منابع و ساختارهای گوناگون پلی ساکاریدهای طبیعی ضروری به نظر می رسد (مسعودپور، ۱۳۹۵).

ساختار پلی ساکاریدها تنوع کمتری نسبت به پروتئین ها دارد بنابراین نقش کمتری در سیستم های زنده ایفا می کنند. با این وجود پلی ساکاریدها می توانند اجزای ساختاری دیواره سلولی گیاهان باشند، در شناخت آنتی ژن-آنتی بادی و فعل و انفعالات هورمون های گیرنده دخالت داشته باشند و نیز به سادگی قادر به ذخیره انرژی هستند. رایج ترین مونوساکاریدهایی که ساختار پلی ساکاریدها را تشکیل می دهند در شکل 1-3 آمده است. تعداد و توزیع مونوساکاریدها در طول زنجیر پلیمری ساختار اولیه پلی ساکارید را تشکیل می دهد. این مونوساکاریدها با اتصال های مختلف می توانند آزادی حرکت را محدود کنند تا اینکه ساختار ثانویه در زنجیر به وجود آید. حضور مونوساکاریدها مهم هستند اما خواص فیزیکی مانند حلالیت، ویسکوزیته و توانایی تشکیل ژل بیشتر به اتصالات مونوساکاریدها بستگی دارد تا نوع مونوساکاریدها (Walter, 1998).



شکل 1-3: مونوساکاریدهای رایج در ساختار پلی ساکاریدها (Walter, 1998).

پلی ساکاریدها را براساس توالی واحدهای قندی می توان به سه گروه متناوب¹، منقطع² و غیرمتناوب³ تقسیم بندی کرد. پلی ساکاریدهای متناوب، از واحدهای قندی که به طور مرتب و منظم در یک الگو تکرار شده است تشکیل شده اند. در پلی ساکاریدهای منقطع، زنجیره ایی با توالی تکراری توسط توالی نامنظم جدا می شوند. در

¹ Periodic
² Interrupted
³ Aperiodic

نوع غیرمتناوب، واحدهای قندی و موقعیت اتصالات نامرتب است (Cui, 2005). طبقه بندی پلی ساکاریدها در جدول 1-4 ارائه شده است.

جدول 1-4: طبقه بندی پلی ساکاریدها با توجه به نوع توالی واحدهای قندی در زنجیره‌های کربوهیدرات (Cui, 2005).

نوع توالی	نوع واحد قندی	عملکرد	پلیمر
---○-○-○-○-○---	آلفا-دی-گلوکوپیرانوز (○)	ذخیره سازی انرژی	نوع متناوب (دوره ای) آمیلوز
---●-●-●-●-●---	بتا-دی-گلوکوپیرانوز (●)	مواد ساختاری	سلولز
--○-○-○-○-○-○-●-●-●- ●-●-●-○-○-○-○-○---	اسید الفال-گلوکورونیک (○) و بتا-دی-مانورونیک (●)	تشکیل ژل داخل و خارج سلولی	نوع منقطع آلژینات ها
--○-○-○-○-○-○-▲-○-▲- ○-▲-○-○-○-○-○-○-○---	اسید آلفا-دی-گالاکتورونیک (○) و ال-رامنوپیرانوز (▲)	اجزای دیواره سلولی گیاهان	پکتین
		برخی از الیگوساکاریدها در خون	نوع نامتناوب زنجیره‌های الیگوساکاریدی از گلیکوپروتئین ها

1-3-1- منابع دریایی پلی ساکاریدها

جلبک های دریایی از منابع عظیم میکروارگانیزم های دریایی هستند که مورد توجه بسیاری از صنایع دارویی و درمانی جهت تولید محصولات آینده قرار گرفته اند. حدود ۵۰۰ گونه جلبک خوراکی به عنوان منبع غذایی شناخته شده است و ۱۶۰ گونه از آن ها مصارف تجاری مهمی دارند. بسیاری از جلبک ها جزو رژیم غذایی مردم آسیای شرقی، جزایر پاسفیک، آمریکای شمالی، شمال اروپا و مردم هاوایی هستند. جلبک های دریایی به دلیل مقادیر پایین چربی های اشباع، کالری کم، میزان فراوان کربوهیدرات ها و نیز ویژگی های زیستی مانند خواص ضد باکتریایی، ضد اکسندگی، ضد ویروسی و ضد قارچی به مواد طبیعی پر کاربرد در صنایع غذایی و دارویی تبدیل شده اند (رستمی و همکاران، ۱۳۹۵).

همچنین جلبک های دریایی مقادیر بالای مواد معدنی، فیبرهای رژیمی، ویتامین ها، پروتئین ها و اسیدهای چرب چند غیراشباع دارند. تا کنون انواع متنوعی از جلبک های دریایی شناسایی شده اند که در سه گروه جلبک های سبز^۱، قهوه ای^۲ و قرمز^۳ طبقه بندی می شوند. در جلبک های دریایی رنگدانه ها و متابولیت های ثانویه نظیر ترکیبات فنولیک نیز وجود دارد. دسته ای از درشت مولکول ها که به تازگی توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است، پلی ساکاریدهای سولفات هستند. پلی ساکاریدهای سولفات در دیواره سلولی جلبک ها وجود دارد و ساختار شیمیایی آن ها با توجه به نوع گونه جلبکی متفاوت است. این ترکیبات در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی-آرایشی، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی کاربرد فراوانی دارند. پلی ساکاریدهای سولفات کاربردهای تجاری متنوعی دارند و در صنعت به عنوان تثبیت کننده، قوام دهنده، امولسیفایر و همچنین در مواد غذایی و نوشیدنی ها استفاده می شوند. از این رو، در طی سال های اخیر استخراج پلی ساکاریدها از جلبک های دریایی و تعیین ویژگی های شیمیایی و

¹ Chlorophyta

² Pheophyta

³ Rhodophyta

خواص بیولوژیکی آن ها توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است. عمده ترین پلی ساکاریدهای استخراج شده از جلبک های دریایی، فوکوئیدان^۱ و لامیناران^۲ از جلبک های قهوه ای، کاراگینان^۳ از جلبک های قرمز و اولوان^۴ از جلبک های سبز هستند (مسعودپور، ۱۳۹۵).

1-3-2- منابع حیوانی پلی ساکاریدها

از مشهورترین پلی ساکاریدهای حیوانی گلیکوژن، ترکیبات زیست فعال کیتین و کیتوزان هستند. کیتین در واقع یک پلیمر آمینو پلی ساکاریدی است و کیتوزان ترکیب استیله شده کیتین می باشد. کیتین در پوسته های بیرونی سخت پوستان و دیواره سلولی برخی قارچ ها دیده می شود. کیتین و کیتوزان نسبت به آنزیم های پستانداران مقاوم هستند و از این نظر جزو فیبرهای رژیمی محسوب می شوند. نتایج بسیاری از مطالعات انجام شده مزایای فیزیولوژیکی استفاده از کیتین را تایید کردند (Stephen, 1995).

¹ Focoidan

² Laminaran

³ Carrageenan

⁴ Ulvan

1-3-3- منابع میکروبی پلی ساکاریدها

بعضی از باکتری ها، قارچ ها و مخمرها به طور طبیعی پلی ساکارید تولید می کنند. خصوصیات زیست فعالی برخی پلی ساکاریدهای تولید شده به وسیله این میکروارگانیسم ها تایید شده است. مشهورترین پلی ساکاریدهای میکروبی زانتان، ژلان و پلولان هستند. صمغ زانتان از مهمترین پلی ساکاریدهای میکروبی شناخته شده است که یک محصول خارج سلولی است و توسط باکتری زانتوموناس کامپستریس¹ و برخی دیگر از گونه های زانتوموناس تولید می شود. ویژگی های منحصر به فرد صمغ زانتان، حلالیت آن در آب سرد و گرم، ایجاد محلول های بسیار ویسکوز در غلظت های کم صمغ و خواص شبه پلاستیک آن است که منجر به کاربرد بسیار وسیع آن در صنایع غذایی شده است. صمغ ژلان یک هتروپلی ساکارید آنیونی میکروبی با ساختار خطی است که جهت ایجاد ژل به یک فرایند حرارتی و همچنین حضور کاتیون ها نیاز دارد. کاتیون های دو ظرفیتی در مقایسه با کاتیون های یک ظرفیتی اثر قابل ملاحظه تری بر خواص رئولوژیکی صمغ ژلان دارد که علت آن تفاوت در مکانیسم تشکیل ژل توسط این کاتیون ها در صمغ ژلان است. صمغ ژلان در صنعت فرآورده های گوشتی به عنوان یک جایگزین چربی به کار می رود و توانایی ایجاد محصولی با بافت، رنگ و خواص ارگانولپتیکی مشابه نمونه پرچرب را دارد (رحمن و همکاران، ۱۳۹۲).

پلولان پلی ساکاریدی مشتمل بر واحدهای مالتوتریوز است که توسط پیوندهای $\alpha(1 \rightarrow 4)$ و $\alpha(1 \rightarrow 6)$ به هم متصل شده اند. به عنوان یک ماده خوراکی در بیشتر پلیمرهای بی مزه، پلولان به عنوان یک محصول تجاری مزه دهنده مورد استفاده قرار می گیرد. پلولان همچنین به عنوان یک ماده اولیه در تولید دارو و غذا مورد استفاده قرار می گیرد. پلولان به طور تجاری توان پوشش دادن محصولات را دارد و به عنوان ترکیب غذایی به کار می رود. این صمغ یک درشت مولکول با هضم کند است که به غذاهای کم کالری اضافه می شود تا مقدار کالری مواد غذایی را افزایش دهد.

¹ *Xanthomonas campestris*

بیش از دو دهه است که در ژاپن از پلوان به عنوان یک افزودنی غذایی و مکمل دارویی استفاده می شود (کلانتر و همکاران، ۱۳۸۹).

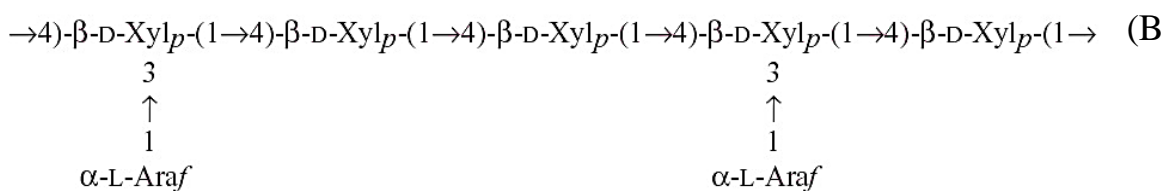
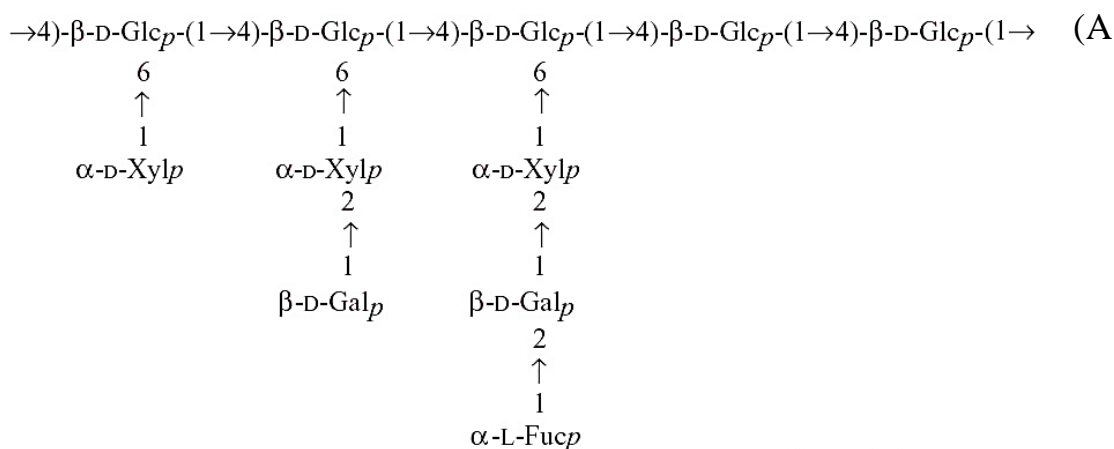
1-3-4- منابع گیاهی پلی ساکاریدها

دیواره سلولی گیاهان از پلی ساکاریدهای مانند سلولز^۱، زایلوگلوکان ها^۲، هتروگزیلان ها^۳، مانان ها^۴ و پلی ساکاریدهای پکتیکی^۵ در مقادیر مختلف تشکیل شده است. هر ساله گیاهان 1/5 تریلیون تن سلولز تولید می کنند. سلولز از واحدهای گلوکز با اتصالات β 1→4 تشکیل شده است. مولکول های سلولز عمدتاً 300-1700 واحد گلوکز دارند.

زایلوگلوکان ها فراوان ترین همی سلولزهای موجود در میوه ها و سبزیجات هستند. اسکلت این ترکیبات، واحدهای گلوکز با اتصال β 1→4 است و سه چهارم گلوکزها از محل کربن شماره 6 به یک زایلوگز متصلند. بسته به نوع منبع واحدهای گالاکتوز، فروکتوز و سایر قندها نیز ممکن است به عنوان بخشی از زنجیر جانبی در این ساختار وجود داشته باشند. ساختار زایلوگلوکان در شکل 1-4 (A) نمایش داده شده است.

اسکلت اصلی هتروگزیلان ها متشکل از واحدهای زایلوگز با اتصال β 1→4 است. واحدهای زایلوگز ممکن است از محل C-3 و گاهی C-2 به آرابینوز متصل شده و تولید آرابینوزایلان کنند (Wrolstad, 2012). ساختار آرابینوزایلان در شکل 1-4 (B) ارائه شده است.

¹ Cellulose
² Xyloglucans
³ Heteroxylans
⁴ Mannans
⁵ Pectic polysaccharides



شکل 1-4 (A): زیلوگلوکان (B) آرابینوزایلان (Wrolstad, 2012).

مانان ها در دیواره سلولی گیاهان در حال رشد و معمولاً به صورت گالاکتومانان ها یا گاهی گلوکومانان ها به مقدار کم اما در نقش ساختاری وجود دارند. اسکلت اصلی مانان واحدهای مانوز با اتصال β 1 \rightarrow 4 است. در گالاکتومانان ها، گالاکتوز به کربن 6 برخی از مانوزها متصل می شود.

پلی ساکاریدهای پکتیکی گیاهان احتمالاً بزرگ ترین و پیچیده ترین مولکول هایی هستند که به شکل طبیعی وجود دارند. پکتین مورد استفاده در صنعت غذا معمولاً از سیب یا ضایعات پرتقال استخراج می شود و در اثر فرآیند، به پلی ساکاریدهای ساده تر تجزیه می شوند. پکتین تجاری عمدتاً پلی مری از اسید D- گالاکتورونیک اسید با اتصالات α 1 \rightarrow 4 است که دارای مقادیر کمی رامنوز است (Wrolstad, 2012).

1-4- استخراج

استخراج، جدا کردن بخش های فعال با استفاده از حلال های انتخابی و استاندارد است. به طور کلی مطالعه گیاهان دارویی با روش های پیش استخراج و استخراج شروع می شود که یک گام مهم در پردازش ترکیبات زیست فعال گیاهی است. در واقع روش کلی برای این کار وجود ندارد و بیشتر به پیچیدگی های ساختاری و تنوع طبیعی بستگی دارد. می توان با اعمال تغییراتی در دما، فشار، pH و نوع حلال دقت عمل استخراج را بالا برد (Smith, 2003).

روش های مرسوم مانند خیساندن¹ و سوکسله معمولاً در محدوده تحقیقات و شرکت های تولیدی کوچک مورد استفاده قرار می گیرد. پیشرفت های مهم در فراوری گیاهان دارویی مانند روش های استخراج مدرن از جمله استخراج با مایکروویو²، استخراج با امواج فراصوت³، استخراج با سیال فوق بحرانی⁴ انجام گرفته است که هدف از این پیشرفت ها، افزایش عملکرد و کاهش هزینه بوده است. از نمونه های گیاهی تازه و خشک برای استخراج استفاده می شود که در نمونه تازه حداکثر تا 3 ساعت بعد از برداشت فرآیند انجام می گیرد اما استفاده از نمونه های خشک ارجحیت دارد. کاهش اندازه ذرات، سطح تماس بین نمونه و حلال های استخراج را افزایش می دهد. خرد کردن منجر به کوچک شدن تکه های درشت می شود در حالی که نمونه های پودر شده دارای ذرات همگن و کوچک تری هستند و سطح تماس بهتری با حلال ایجاد می کنند. اندازه ذرات کوچکتر از 0/5 میلی متر ایده آل ترین اندازه برای استخراج کارآمد است (Nn, 2015).

¹ Maceration

² Microwave-assisted

³ Ultrasound-assisted extraction

⁴ Supercritical fluid extraction

1-4-1- استخراج و حلالیت پلی ساکاریدها

ترکیب شیمیایی و ویژگی های ساختاری در حلالیت پلی ساکاریدها تاثیر گذار است. حضور شاخه در زنجیره های پلیمری باعث ایجاد اختلال در اتصال بین مولکولی و تسریع حل شدن می شود. حضور گروه های کربوکسیل (COO^-) و سولفات (SO_4^{2-}) در زنجیره های پلیمر، حلالیت را بهبود می بخشد و از طریق نیروی دافعه الکتروستاتیک مانع تجمع بین مولکولی می شود. پلی ساکاریدهای آنیونی نسبت به نوع خنثی محلول تر هستند (Cui, 2005).

اتصالات 1→4 متقارن و منظم باعث تسهیل اتصال بین مولکولی و تجمع واحدهای قندی بین زنجیرها می شود. اتصالات 1→3 حلالیت پلیمرهای کربوهیدرات را افزایش می دهد. اتصالات 1→6 به طور چشمگیری حلالیت کربوهیدرات را بهبود می بخشد به طور مثال دکستران و پلولان ها به راحتی در آب حل می شوند. اتصالات گلیکوزیدی نوع α باعث حلالیت کامل نمی شود اما در مقایسه با نوع β حلالیت بیشتری دارند. هتروپلی ساکاریدها که متشکل از دو یا چند نوع واحد مونوساکارید هستند محلول تر از هموپلی ساکاریدها هستند (Cui, 2005).

شایع ترین عوامل موثر در فرآیند استخراج ویژگی های ماتریکس گیاه، حلال، دما، فشار و زمان است (Azmir *et al.*, 2013).

1-4-2- روش های جداسازی و استخراج پلی ساکاریدها

مطالعات کیفی و کمی ترکیبات زیست فعال گیاهی، بیشتر به انتخاب روش مناسب استخراج بستگی دارد که نقش مهمی را در نتیجه نهایی ایفا می کند. تمام روش هایی که برای استخراج استفاده می شود اهداف مشترکی دارند از جمله عصاره گیری ترکیبات زیست فعال از نمونه، افزایش انتخاب روش های آنالیز، افزایش حساسیت زیست سنجی به دلیل افزایش غلظت ترکیبات هدف، تبدیل ترکیبات زیست فعال به شکل مناسب برای شناسایی و جداسازی، ارائه یک روش قوی و قابل بازیافت که تغییری در ساختار نمونه ایجاد نکند (Azmir *et al.*, 2013).

پلی ساکارید دیواره سلولی را باید از مواد دیواره سلولی نامحلول جدا کرد. حذف چربی موجود در غشای سلولی قبل از استخراج ضروری است به دلیل اینکه وجود چربی نفوذ آب را محدود می کند و تاثیر منفی بر راندمان استخراج می گذارد. لیپیدها معمولاً با حلال هایی مثل کلروفرم – متانول (95:5 v/v)، اتانول 90٪، دی اکسان و هگزان حذف می شوند (Cui, 2005). طرح کلی برای استخراج مداوم پلی ساکاریدها از دیواره سلولی گیاهی (میوه و سبزیجات) در جدول 1-5 ارائه شده است.

جدول 1-5: روش های استخراج پلی ساکاریدها از دیواره سلولی گیاهی (میوه و سبزیجات) (Cui, 2005).

پلی ساکاریدهای محلول	اثر	تیمار
خنثی، بتا-گلوکان های محلول در آب، آرابینوکسیلان ها، آرابینوگالاکتان ها	روش استخراج متداول پلی ساکارید، شکستن برخی از باندهای هیدروژنی، برهم کنش های واندروالسی	آب در دماهای مختلف با اعمال فیزیکی (هم زدن، لرزاندن)
پلی ساکاریدهای اسیدی، پلی ساکاریدهای شاخه دار موجود در میانه با مقدار اندک.	جداسازی کلسیم از پکتین ها و شکستن باندهای یونی	سیکلو هگزان دی آمین تترا استیک اسید (CDTA) 50 میلی مولار در دمای 20°C
شمار بسیاری از پلی ساکاریدهای پکتیکی شاخه دار	جداسازی کلسیم محصور در دیواره ماتریکس و شکستن باندهای یونی، شکاف در برخی از باندهای استری	کربنات سدیم (Na ₂ CO ₃) + 20 میلی مولار برو هیدرات سدیم (NaBH ₄) در دمای 1°C و 20°C

پتاسیم هیدروکسید (KOH) 1 مولار جدا کردن پیوندهای فنل از شمار زیادی از پکتین های شاخه دار: + 20 میلی مولار برو هیدرات سدیم کربوهیدرات های استری و جدا کردن گلیکوپروتئین ها که معمولاً به عنوان پیوندهای پروتئینی از کربوهیدرات ها، بتا-گلوکان های نامحلول در آب، شکستن پیوندهای هیدروژنی آرابینوکسیلان ها، گلوکورونو آرابینوزایلان ها، زایلوگلوکان های شاخه دار

پتاسیم هیدروکسید 4 مولار + 20 میلی متورم کردن سلولز و شکستن باندهای عمدتاً زایلوگلوکان های شاخه دار مولار برو هیدرات سدیم هیدروژنی

کلریت/اسید استیک (3/0٪ وزنی) - شکستن پیوندهای فنلی و لیگنین هیدروکسی پرولین (گلیکوپروتئین های حجمی و 12٪ حجمی - حجمی) در زدایی کم غنی هستند و همچنین مقداری دمای 70° C پیوندهای پلی ساکارییدی پکتیکی دارد)

به تازگی روش های مختلفی برای استخراج پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار گرفته است از جمله استخراج با مایکروویو، استخراج با امواج فراصوت، استخراج با حلال شتاب دهنده¹، که در میان این روش ها استخراج با امواج فراصوت کارآمدتر، ارزان تر و ساده تر از سایر روش ها بوده است (Maran *et al.*, 2014).

در حال حاضر بیشتر پلی ساکاریدها به خاطر محلول بودن در آب گرم و آسیب کمتر توسط آب داغ استخراج می شوند. برای استخراج مطلوب پلی ساکاریدها از دو روش آب داغ و آنزیمی به طور همزمان می توان استفاده کرد تا عملکرد استخراج افزایش یابد (نبی کلجاهی، 1397).

¹ Accelerated solvent extraction

1-5- خالص سازی و شناسایی ساختار پلی ساکاریدها

شناسایی پلیمرهای کربوهیدراتی، به جداسازی و خالص سازی پلیمر از منبع اصلی بستگی دارد (Andersson *et al.*, 2006). پروتئین ها از مهم ترین ترکیبات محلول موجود در اندام های گیاهی هستند که متداول ترین روش حذف آن ها، روش سواگ است. در این روش پروتئین ها در یک امولسیون حاوی کلروفورم واسرشت می شوند و پس از فرآیند سانتریفیوژ، لایه ای ژل مانند در حد واسط کلروفورم-آب تشکیل می دهند. به این صورت پلی ساکاریدهای فاقد پروتئین به آسانی توسط فاز آبی موجود در بالای لایه ژلی جدا می شوند (Staub, 1965).

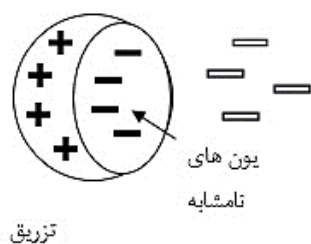
انواع متعددی از روش های کروماتوگرافی برای جداسازی پلی ساکاریدها از یکدیگر و همچنین ناخالصی های غیر کربوهیدراتی مورد استفاده قرار می گیرد. کروماتوگرافی ژل تراوا برای هر دو دسته از پلی ساکاریدهای خنثی و آنیونی مناسب است و آن ها را بر اساس وزن مولکولی و حجم هیدرودینامیکشان جدا می کند (جهان بین، 1390). ماتریکس های ژل در کروماتوگرافی که به صورت تجاری در دسترس هستند در جدول 1-6 آمده است.

کروماتوگرافی تبادل یون با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل سلولز برای جداسازی پلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی متداول و اختصاصی است. در این روش، پلی ساکاریدهای خنثی بدون ایجاد برهمکنش از داخل ستون عبور می کنند. در حالی که پلی ساکاریدهای اسیدی به دلیل دارا بودن بارهای منفی در ستون باقی می مانند و در نهایت توسط بافر، با افزایش قدرت یونی یا pH، شسته شده و از ستون خارج می شوند (Cui, 2005). در شکل 1-5 مکانیسم کروماتوگرافی تبادل یونی ارائه شده است.

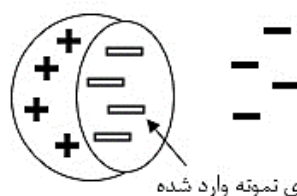
جدول 1-6: انواع ماتریکس ژل کروماتوگرافی (حامدی و همکاران، 1393)

نوع ژل	محدوده وزن مولکولی قابل جداسازی (Da)
سفادکس G-10	<700
سفادکس G-15	1500
سفادکس G-25	5000-1000
سفادکس G-50	30000-1500
سفادکس G-75	70000-3000
سفادکس G-100	100000-4000
بیو-ژل P-100	100000-5000
سفادکس G-200	600000-5000
سفاکریل S-300	1500000-10000
سفاروز 4B	20000000-600000
سفاروز 6B	4000000-10000

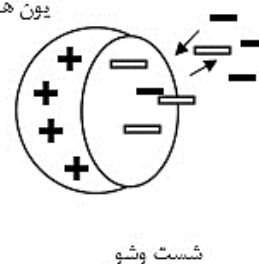
1- ورود یون های نمونه



2- خروج یون های تماشابه



جذب: جایگزینی یون های تماشابه



شکل 1-5: مکانیسم کروماتوگرافی تبادل یونی (حامدی و همکاران،

اطلاعات زیادی در مورد انواع پلی ساکاریدهای دیواره سلولی وجود دارد اما ساختار ظریف و روش تجمع پلی ساکاریدها برای تشکیل این ساختار قوی کمتر شناخته شده است. دیواره ها در ابتدا باید از ماده گیاهی جداسازی شوند که این کار معمولاً توسط تیمارهای اسیدی یا آنزیمی به منظور شکستن پلی ساکاریدها به مونوساکاریدهای سازنده و سپس شناسایی مونوساکاریدها و بازسازی استنتاجی پلی ساکاریدها انجام می شود (Wrolstad, 2012).

هنگام مطالعه ساختار پلی ساکارید ناشناخته چند سوال مطرح می شود:

1- از چه تعداد مونوساکارید تشکیل شده است؟

2- مونوساکاریدها با چه نظمی به یکدیگر متصل شده اند؟

3- ساختار خطی یا شاخه ای دارند؟

4- قندهای موجود فرم پیرانوز یا فورانوز هستند؟

5- اتصال گلیکوزیدی آلفا یا بتا دارند یا هر دو؟

6- وزن مولکولی آن به چه مقدار است؟ (Walford, 2010)

1-5-1- روش های شیمیایی

1-5-1-1- تعیین وزن مولکولی

خواص پلی ساکاریدها مانند خواص رئولوژیکی به شدت به وزن مولکولی و توزیع وزن مولکولی آن ها ارتباط دارد (Rassi, 1995). پلی ساکاریدها معمولاً چندبخشی¹ هستند و طیف گسترده ای از وزن مولکولی، ساختار و توالی دارند. آگاهی از اندازه، ساختار و ترکیب، اطلاعات مفیدی را برای درک بهتر رفتار محلول و فعل و انفعالات داخل و بین مولکولی، رئولوژی و عملکرد پلی ساکاریدها می دهد. کروماتوگرافی نفوذ ژلی با تفرق نوری چند زاویه² روش مفیدی برای توصیف خصوصیات پلی ساکاریدها است.

شرح دقیق وزن مولکولی یک پلی ساکارید نیازمند داشتن اطلاعاتی از میانگین وزن مولکولی و توزیع وزن مولکولی است. چهار نوع وزن مولکولی تعریف شده است که معمولاً مورد استفاده قرار می گیرد از جمله میانگین عددی وزن مولکولی (M_n)³، میانگین وزنی وزن مولکولی (M_w)⁴، میانگین Z وزن مولکولی (M_z)⁵ و میانگین ویسکوزیته

¹ Polydisperse

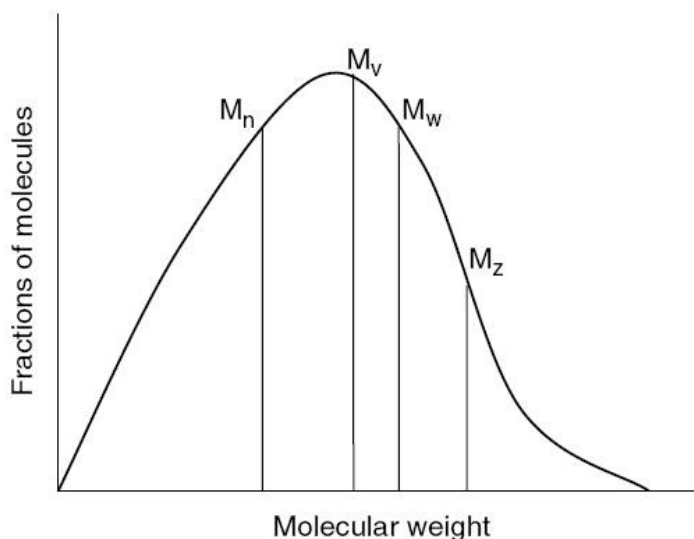
² Gel permeation chromatography with multi-angle light scattering

³ Number average molecular weight

⁴ Weight average molecular weight

⁵ Z-average molecular weight

وزن مولکولی (M_v)¹ (Cui, 2005). در شکل 6-1 چهار نوع وزن مولکولی نمایش داده شده است. همچنین روش هایی که برای به دست آوردن چهار نوع وزن مولکولی فوق مورد استفاده قرار می گیرد در جدول 7-1 ارائه شده است.



شکل 6-1: نمایش چهار نوع وزن مولکولی (Carraher, 2000).

از رایج ترین روش ها برای تعیین وزن مولکولی پلی ساکاریدها می توان به غشای اسمومتری²، پراکنش نور ساکن³، سانتریفیوژ فوق سریع⁴، ویسکومتری⁵ و کروماتوگرافی فیلتر ژلی⁶ اشاره کرد (Carraher, 2000). کروماتوگرافی ژل تراوا (غربال مولکولی)⁷ جدیدترین روشی است که امروزه برای تعیین وزن مولکولی پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار می گیرد (صحراگرد، 1395).

¹ Viscosity average molecular weight

² Membrane osmometry

³ Static light scattering

⁴ Ultracentrifugation (sedimentation)

⁵ Viscometry

⁶ Gel filtration chromatography

⁷ High performance size-exclusion or gel chromatography (HPSEC) or (HPGPC)

جدول 1-7: روش های محاسبه انواع وزن مولکولی (Carraher, 2000).

Method	Type of MW Average	Applicable MW Range	Other Information
Light scattering (LS)	M_w		Shape
Membrane osmometry	M_n	<500,000	
Centrifugation			
Sedimentation equilibrium	M_z		
Sedimentation velocity	Gives a real MW only for monodisperse systems		
Small angle x-ray scattering	M_w		
Size exclusion chromatography (SEC)	Calibrated		MW distribution
Viscometry	Calibrated		
End-group analysis	M_n	<20,000	
Coupled SEC-LS			M_w, M_n , MW distribution, shape
Viscometry and sedimentation	Calibrated		
Sedimentation velocity and dynamic LS	M_w		

2-1-5-1- تعیین مونوساکاریدهای سازنده

پلی ساکاریدهای عصاره گیاهی، حاوی مخلوطی از قندها هستند. این در حالی است که محققین علاقه مند به شناسایی قندها به صورت مجزا و اندازه گیری غلظت آن ها هستند که برای این کار نیاز به هیدرولیز پلی ساکاریدها توسط اسید تری فلورواستیک است. مقدار و نوع قندهای حاصل از هیدرولیز با روش های کروماتوگرافی سنجیده می شود (Wrolstad, 2012).

از سایر اسیدها مانند اسید کلریدریک و سولفوریک نیز می توان برای هیدرولیز استفاده کرد. برای بیشتر کربوهیدرات ها استفاده از اسید تری فلورواستیک نسبت به دو اسید دیگر برتری دارد که علت آن کارایی بالاتر این اسید در هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی بدون تخریب گسترده در ترکیبات مونوساکاریدی حاصل و نیز فراریت آن است. فراریت این اسید باعث می شود تا تداخل آن با روش هایی مانند استیله کردن ترکیبات مونوساکاریدی به حداقل برسد (Benhura *et al.*, 2002). اسید سولفوریک برای هیدرولیز لایه های فیبری از جمله سبوس گندم، کاه، سیب و میکروکریستال های سلولز مناسب تر است (Cui, 2005).

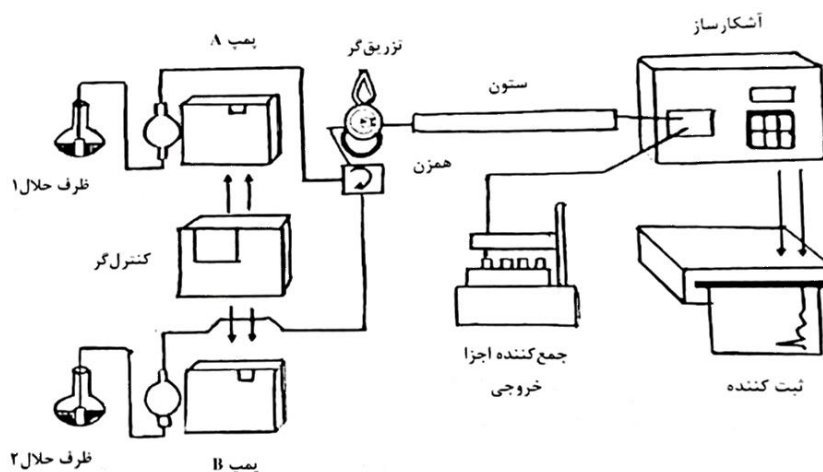
روش های کروماتوگرافی از مزیت حذف مواد مزاحم و امکان حفظ نشانه ها برخوردارند که به شناسایی این قندها کمک می کنند. متداول ترین روش برای کسب اطلاعات کیفی و کمی مونوساکاریدها استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)¹ و کروماتوگرافی گازی (GC)² است. برخلاف روش های آنزیمی که برای یک نوع مونوساکارید خاص استفاده می شود، روش های کروماتوگرافی برای یک یا چند نوع مونوساکارید در یک نمونه مورد استفاده قرار می گیرد (Cui, 2005; Wrolstad, 2012).

¹ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

² Gas Chromatography (GC)

1-2-1-5-1- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

امروزه بیش از نیمی از آنالیزهای جداسازی و شناسایی توسط این روش کروماتوگرافی انجام می شود. تفاوت این تکنیک نسبت به روش های کروماتوگرافی سنتی، در قطر کم ستون، فشار زیاد برای افزایش سرعت، آشکارسازهای حساس، خودکار بودن آن، سرعت بالای آنالیز، قدرت تفکیک زیاد و نیاز به مقدار کم نمونه برای آنالیز است (حامدی و همکاران، 1393). یک سیستم معمولی HPLC از مخزن حلال، پمپ، ستون، آشکارساز و سیستم ثبت اطلاعات تشکیل شده است که در شکل 1-7 نمایش داده شده است.



شکل 1-7: اجزای اصلی دستگاه HPLC (حامدی و همکاران، 1393).

این روش کروماتوگرافی با زمان فرایند 20 دقیقه یا کمتر، دارای مزیت کمی و سریع بودن است. برای بسیاری از کاربردها، آماده سازی کمی برای نمونه نیاز است. از آنجا که تشخیص با UV به دلیل تداخل احتمالی در محدوده زیر UV که قند در آن جذب دارد غیر عملی است، آشکارسازهای ضریب شکست با حساسیت 1 mg رواج بیشتری دارند. در بسیاری از نمونه های قندی، غلظت قند به گونه ای است که در دامنه حساسیت دستگاه قرار دارد.

کروماتوگرافی فاز نرمال^۱، ستون های رزینی تبادل کننده کاتیونی کلسیم^۲ و ستون های تبادل کننده آنیونی^۳ به طور گسترده در آنالیز قندها استفاده می شوند (Wrolstad, 2012).

2-2-1-5-1-1- کروماتوگرافی گازی (GC)

ستون در کروماتوگرافی گازی با ماده جامد متخلخلی که توسط لایه ای نازک از یک مایع غیر فرار پوشیده شده و به عنوان فاز ساکن عمل می کند، پر می شود. جداسازی به علت تفاوت در رفتار انحلالی اجزا است. اجزای مخلوط بین فاز گازی و فاز ساکن بر حسب ضریب تقسیم خودشان توزیع می شوند (Stock *et al.*, 1974). شمای دستگاه کروماتوگرافی گازی در شکل 1-8 آمده است.

قندها فرار نیستند و پیش از آنالیز با دستگاه GC باید مشتق سازی شوند. تشکیل استات های آلدیتول^۴ روشی است که به طور گسترده در جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار قندها در پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار می گیرد. پس از هیدرولیز پلی ساکاریدها، قندها با بوروهیدرات سدیم^۵ به آلدیتول ها احیاء شده و سپس تمام گروه های هیدروکسیل با استفاده از انیدرید استیک^۶ استیله می شوند. مشتقات استات های آلدیتول برای آنالیز پلی ساکاریدهای دیواره سلولی ارجحیت دارد و این روش بسیار حساس بوده و قدرت تشخیص آن 20 ng است (Melton *et al.*, 2001; Wrolstad, 2012).

¹ Normal-phase chromatography

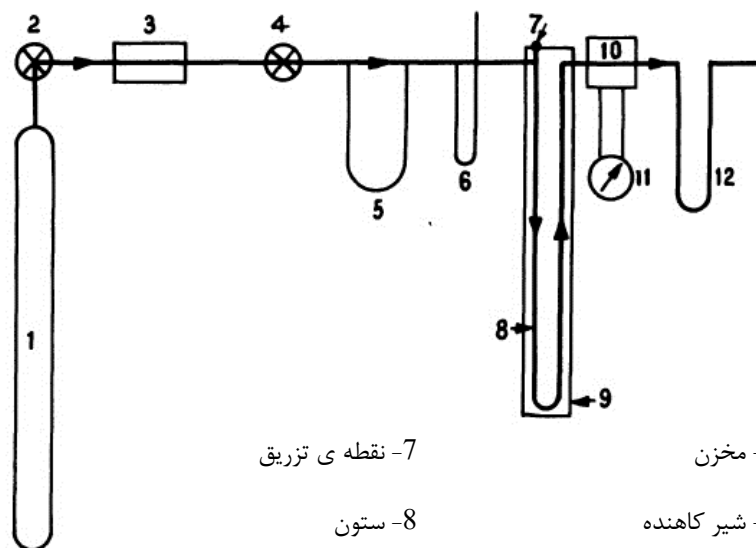
² Calcium-loaded cation exchange resin columns

³ Anion-exchange columns

⁴ Alditol acetates

⁵ Sodium borohydride

⁶ Acetic anhydride



- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 1- مخزن | 7- نقطه ی تزریق |
| 2- شیر کاهنده | 8- ستون |
| 3- خشک کننده | 9- آون |
| 4- شیر کنترل دقیق | 10- پیل آشکارساز |
| 5- جریان سنج | 11- ثبات |
| 6- فشار سنج | 12- جریان سنج حباب صابونی |

شکل 1-8: شمای دستگاه کروماتوگرافی گازی (Stock *et al.*, 1974).

3-1-5-1- تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی

متداول ترین روش های مورد استفاده برای شناسایی موقعیت پیوندهای گلیکوزیدی متیلاسیون¹، هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)² و اکسایش پریودات³ است. هدف از این روش ها تشکیل مجموعه ای از مشتقات است که نیاز به جداسازی دارد و برای شناسایی نوع حلقه و موقعیت پیوندها مورد استفاده قرار می گیرد (Walford, 2010).

¹ Methylation

² Partial acid hydrolysis

³ Periodate oxidation

موقعیت نسبی هر قند شامل مشتقات پیوندی آن قند و رشته های بازشده از زنجیرهای پلی ساکارید است (Cui, 2005).

1-3-1-5-1- متیلاسیون

آنالیز متیلاسیون شامل متیله کردن تمام گروه های هیدروکسیل آزاد، هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی، کاهش با NaBD_4 و استیله کردن نقاط اتصال هیدرولیز شده است. بنابراین هیدروکسیل هایی که استیله شدند همان هایی هستند که با مونوساکاریدها اتصال داشتند. استات های آلدیتول حاصل از متیلاسیون توسط دستگاه GC-MS شناسایی می شوند (Popa, 2011; Rassi, 1995). شرط لازم برای واکنش متیلاسیون، حلالیت کامل پلی ساکاریدها در دی متیل سولفوکسید¹ است. این حلالیت را می توان با تکان دادن یا استفاده از امواج فراصوت با دمای بالا (C) 70° به دست آورد. انحلال ناقص موجب نتیجه نادرست در ساختار می شود (Cui, 2005). مراحل آنالیز متیلاسیون در شکل 1-9 آمده است.

¹ Dimethyl Sulfoxide (DMSO)



شکل 1-9: مراحل متیلاسیون (Cui, 2005).

2-3-1-5-1- هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)

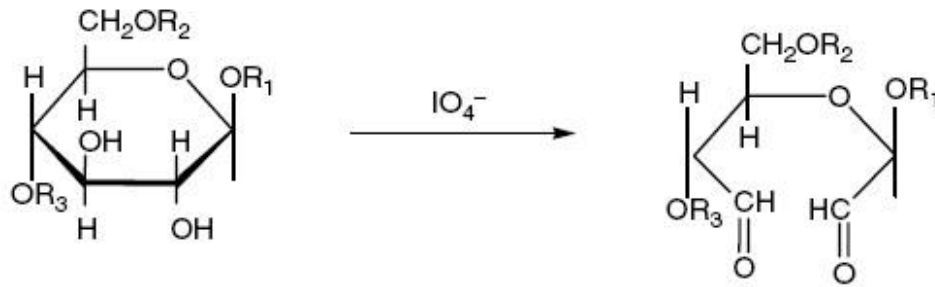
هیدرولیز ناقص اسیدی به عنوان روشی سودمند در تعیین ساختار پلی ساکاریدها شناخته شده است. با استفاده از این روش می توان پلی ساکاریدها را به طور تصادفی به مخلوطی از مونو و الیگوساکاریدها تبدیل کرد. همچنین با توجه به تفاوت در پایداری اتصالات گلیکوزیدی مونوساکاریدهای مختلف، می توان اطلاعات مفیدی پیرامون توالی واحدهای سازنده و نحوه اتصالات آن ها با توجه به مونو و الیگوساکاریدهای حاصل از هیدرولیز اسیدی ناقص به دست آورد. مونوساکاریدها با حلقه های فورانوز در مقابل اسید بسیار ناپایدارند و به آسانی تحت شرایط هیدرولیز اسیدی ملایم شکسته می شوند (علیزاده، 1396).

در طی این واکنش برای از بین رفتن یک پیوند گلیکوزیدی یک مولکول آب مصرف می شود. در طول هیدرولیز اسیدی، پلی ساکاریدها در حضور اسید داغ تخریب می شوند با وجود این، تمام پیوندهای گلیکوزیدی در طول زمان هیدرولیز با سرعت یکسان از بین نمی روند و تخریب پیوندهای گلیکوزیدی در طول زمان صورت می گیرد (Cui, 2005).

3-3-1-5-1- اکسایش پریودات و تجزیه اسمیت

روش اکسایش پریودات و تجزیه اسمیت از کارآمدترین روش ها به منظور شناسایی ساختار پلی ساکاریدهاست. نقش پریودات در این آزمون، شناسایی آلدئیدهای پلی ساکاریدی یا گلیکوپروتئین ها است. در این روش کربوهیدرات ها در اثر اکسایش با پریودات دچار تغییر رنگ می شوند. یون های پریودات در مجاورت دیول ها، ارتباط نزدیکی با ساختارهایی همچون 2- هیدروکسی آلدئیدها، 1 و 2 دی کربونیل ها، آلفا- هیدروکسی اسیدها، آلفا کتو اسیدها و آمینو الکل ها دارند. همان طور که در ابتدای این فصل گفته شد، نحوه آرایش کربوهیدرات ها و موقعیت قرارگیری گروه هیدروکسیل آن ها می تواند نقش اساسی در پایداری این دسته از مواد ایفا کند. لذا به منظور اکسید شدن دیول های مجاور یون های پریودات، لازم است که گروه های هیدروکسیل به موقعیت استوایی استوایی یا محوری استوایی متمایل شوند، چرا که گروه های هیدروکسیلی که دارای وضعیت محوری-محوری باشند، توانایی ایجاد واکنش را ندارند (Kristiansen *et al.*, 2010). در شکل ۱-۱۰ اکسایش پریودات یک واحد قندی ارائه شده است.

ترکیب اکسیداسیون پریودات، واکنش احیاء و هیدرولیز اسیدی ملایم تحت عنوان تجزیه اسمیت شناخته می شود. در واقع این روش سبب ایجاد گلیسرول ها در پایانه ها می شود که در حقیقت گروه های غیر احیاء شونده از گلیکوژن گلوکان ها هستند (Nie *et al.*, 2018).



شکل 1-10: اکسایش پربودات یک واحد قندی (Cui, 2005).

4-3-1-5-1- درجه چرخش نوری پلاریمتری

یکی از خواص عمده ی قندها، داشتن فعالیت نوری است. به عبارت دیگر، قندها قادرند صفحه ی نور پلاریزه را بچرخانند. نور معمولی هنگام برخورد با اشیاء پلاریزه نیست، بدین معنی که به صورت پراکنده در تمام جهات حرکت می کند. چنانچه بتوانیم به وسیله ای (الکتریکی و مغناطیسی) اجزای شعاع نور را به یک جهت منحرف کنیم، گفته می شود که نور در صفحه پلاریزه شده است. محلول قندها یا ترکیباتی که حاوی کربن غیر متقارن هستند خاصیت چرخاندن نور پلاریزه را داشته و آن را به چپ یا راست منحرف می کنند. برحسب میزان چرخش نور، می توان به غلظت محلول قند پی برد زیرا رابطه ای بین غلظت، چرخش ویژه و میزان چرخش نور وجود دارد (حسینی، 1386).

تعیین آرایش فضایی اتصالات گلیکوزیدی، با تعیین درجه چرخش نوری ویژه محلول های قندی امکان پذیر خواهد بود. چرخش نوری نسبتاً بالا در پلی ساکاریدها، نشان دهنده وجود تعداد زیادی اتصالات نوع آلفا و چرخش نوری نسبتاً پایین، نشان دهنده وجود تعداد زیادی اتصالات نوع بتا در ساختار پلی ساکارید است (Heinze *et al.*, 2005).

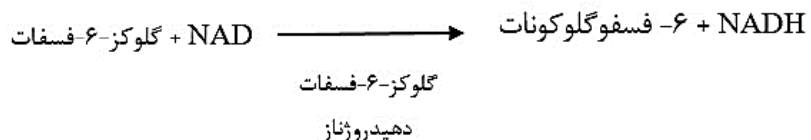
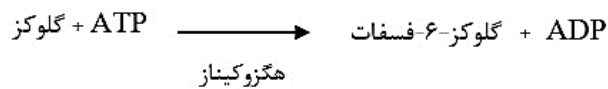
1-5-2- روش های آنزیمی

استفاده از آنزیم ها برای آنالیز ساختار بسیار گسترده شده است. تعیین مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید، تعیین محصولات اکسایش پریودات و تجزیه اسمیت از کاربردهای روش های آنزیمی در تعیین ساختار پلی ساکاریدها است (McCleary *et al.*, 1987). آنزیم های هیدرولیز کننده پلی ساکاریدها به دو گروه اندو و اگزو گلیکوزیدازها تقسیم بندی می شوند. اگزوگلیکوزیدازها مانند بتا آمیلاز، توانایی جداسازی واحدهای مونو و دی ساکاریدی از یک انتهای مولکول که معمولا انتهای غیر احیا کننده آن است را دارند. اندوگلیکوزیدازها مانند آلفا آمیلاز، با عمل اختصاصی خود، همپلی ساکاریدها را به صورت تصادفی تکه تکه کرده و الیگوساکاریدهایی با درجات متفاوت پلیمریزه شدن تولید می کنند.

هیدرولازهای گلیکوزیدی با خلوص بالا نیز مانند بتاگالاکتوزیداز واحدهای مونوساکاریدی به خصوصی را از انتهای غیر احیا کننده پلی ساکارید جدا می کنند. سایر روش ها مانند روش های کروماتوگرافی، طیف سنجی یا رزونانس مغناطیس هسته ای بیشتر به منظور تعیین صحت روش های آنزیمی کاربرد دارند (جهان بین، 1390).

کیت های آنزیمی تجاری نیز وجود دارند که امکان شناسایی اسپکتروفتومتریک فندهای انفرادی را فراهم می کند. کیت های آنزیمی حاوی آنزیم، کوفاکتور و نمک های بافر هستند که برای انجام واکنش مورد نیاز می باشند (Henniger, 1998).

هگزوکیناز و گلوکز اکسیداز از آنزیم های مورد استفاده در تعیین مقدار کمی گلوکز می باشند. گلوکز با هگزوکیناز در حضور آدنوزین تری فسفات به گلوکز-6- فسفات فسفوریله می شود. سپس گلوکز-6- فسفات توسط گلوکز-6- فسفات دهیدروژناز در حضور نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید، به 6- فسفولگلوکونات و NADH تبدیل می شود. تشکیل NADH در 334 nm اندازه گیری می شود و مقدار کمی با غلظت گلوکز رابطه استوکیومتریکی دارد (Wrolstad, 2012). واکنش آنزیمی هگزوکیناز در شکل 1-11 آمده است.



شکل 1-11: واکنش آنزیمی هگزوکیناز (Wrolstad, 2012).

3-5-1- روش های طیف سنجی

طیف سنجی روشی برای تحلیل ساختمان مولکول ها بر پایه نحوه جذب تابش توسط آن هاست. اگرچه انواع متعددی از روش های طیف سنجی وجود دارد. تکنیک هایی که به طور متداول در شیمی آلی کاربرد دارند رزونانس مغناطیس هسته ای¹ (NMR)، مادون قرمز² (IR)، فرابنفش³ (UV) و طیف سنجی جرمی هستند (میر محمد صادقی و همکاران، 1392).

1-3-5-1- طیف سنج فرابنفش - مرئی

طیف نور خورشید به دو ناحیه مرئی و نامرئی تقسیم می شود که ناحیه مرئی نور در محدوده طول موج های 400-750 نانومتری است و ناحیه نامرئی شامل طول موج های کمتر از 400 نانومتر مانند پرتوهای فرابنفش

¹ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer

² Infrared

³ Ultraviolet

(UV) و گاما است. اشعه فرابنفش به دلیل داشتن طول موج کوتاه انرژی بالایی دارد و به طیف های (320-390) A, B(280-320) و C(254-280) نانومتر تقسیم می شود (Hollosy, 2002).

بیشترین کاربرد طیف فرابنفش و مرئی برای پلی ساکاریدها مربوط به تایید مراحل خالص سازی قبلی و اندازه گیری قند کل می باشد. عدم جذب در ناحیه 260 و 280 نانومتر از طیف فرابنفش نشان دهنده عملکرد خوب در مراحل خالص سازی و عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید است (Cui, 2005).

3-3-5-1- طیف سنج مادون قرمز (IR)

این روش وسیله بسیار مفیدی برای تعیین ساختار ترکیبات آلی است، زیرا قادر است حضور اغلب گروه های عاملی را تشخیص دهد و برانگیختگی ارتعاشی اتم های اطراف پیوندهای مربوط به آن ها را اندازه گیری می کند. محل خطوط جذبی بستگی به نوع گروه های عاملی دارد و طیف IR در کل یک الگوی منحصر به فرد برای هر ترکیب خاص نمایش می دهد. مادون قرمز باعث تحریک ارتعاشی پیوندها در مولکول ها می شود. پیوندهای قوی و اتم های سبک در فرکانس های کششی نسبتاً بالا که بر حسب عدد موج (عکس طول موج) اندازه گیری می شوند، ارتعاش می کنند. برعکس پیوندهای ضعیف و اتم های سنگین در اعداد موج پایین تری جذب دارند. به علت تنوع در شیوه های کششی و خمشی، طیف های مادون قرمز معمولاً الگوهای پیچیده ای نشان می دهند. به هر حال از این الگوها با استفاده از ناحیه اثر انگشت می توان برای تشخیص ترکیبات خاصی استفاده کرد (میر محمد صادقی و همکاران، 1392).

طیف سنجی IR مولکول ها را به سطح بالاتر انرژی برانگیخته می کند و پیرامون کربوهیدرات ها با موفقیت به کار گرفته شده اند که در تشخیص ساختار اولیه و آنالیز مستقیم پلی ساکاریدها از فرکانس های قابل شناسایی

کمک گرفته می شود. فرکانس کششی برخی از گروه های عاملی پلی ساکاریدها و بسیاری از مشتقات متداول آن ها نظیر OH، CH، COOH، CONH، COOR و NO₂ به آسانی شناسایی می شود (Lapasin *et al.*, 1995).

طیف سنجی مادون قرمز فوریه¹ (FTIR) تکنیک طیف سنجی متداول دیگری است که معمولاً برای آنالیز دیواره سلولی استفاده می شود. این روش بر اساس ارتعاشات یا انتقال انرژی در پیوندهای شیمیایی مختلف عمل می کند. FTIR روشی بسیار سریع و غیر تهاجمی است که می تواند برآورد کمی از گروه های اصلی مختلف در درشت مولکول های متفاوت شامل استر کربوکسیلیک، آمیدها، پروتئین و اسید کربوکسیلیک را حاصل کند. همچنین اطلاعاتی درباره ترکیبات کربوهیدرات را در اختیار قرار می دهد. مقایسه طیف ها با یکدیگر به منظور به دست آوردن مهم ترین اطلاعات، کاری چالش برانگیز است. پیچیدگی و تغییر پذیری طیف های متفاوت برای به دست آوردن هرگونه اطلاعات از طریق مقایسه بصری طیف ها کاری کاملاً دشوار است. روش های آماری مختلفی جهت مقایسه دو طیف یا بیشتر استفاده می شود. طیف مادون قرمز پلی ساکاریدها با استفاده از نمونه های جامد حاصل می شود (1-10 میلی گرم). جهت آماده سازی نمونه ها می توان از روش تهیه قرص با کمک برومور پتاسیم جامد یا مخلوط کردن با نوزول (نوعی روغن پارافینی با جرم مولکولی بالا) استفاده کرد. سپس نمونه های آماده شده را در محفظه یا سلول های دستگاه مادون قرمز قرار داده و اطلاعات حاصل را به صورت پیک دریافت می کنیم. به طور کلی با استفاده از طیف سنج مادون قرمز در طیف 400-4000 cm⁻¹ دست یافتن به اطلاعاتی نظیر آرایش فضایی آنومری، گروه های عاملی و الگوهای استخلافی در پلی ساکاریدها امکان پذیر خواهد بود (Muralikrishna *et al.*, 2007; Ulvskov, 2010).

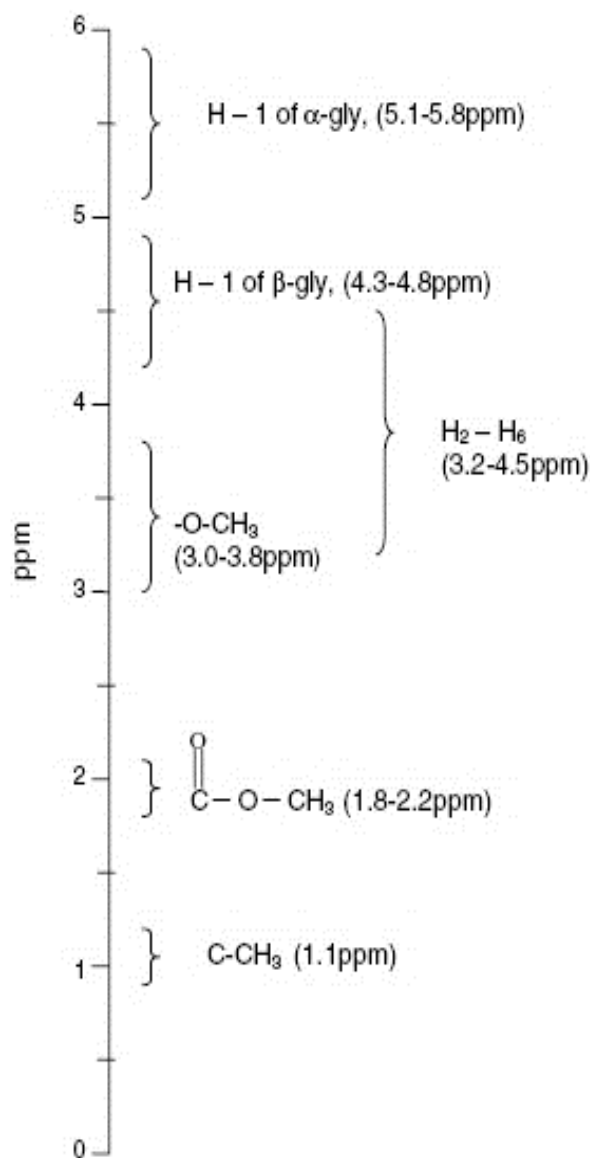
¹ Fourier Transform Infrared

1-5-3-4- طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای

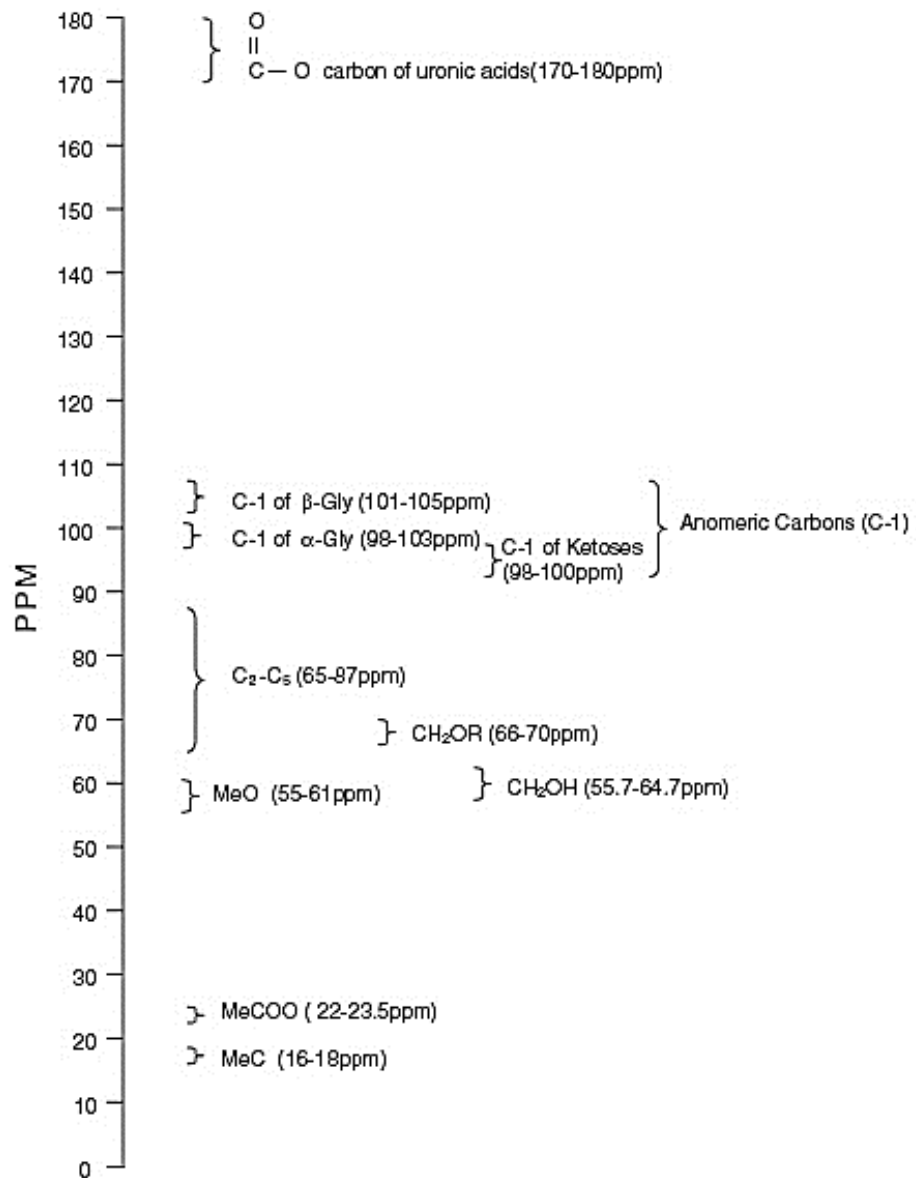
رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR) یک روش طیف سنجی است که امکان شناسایی ساختارهای پلیمری پیچیده از نظر کمی و کیفی را میسر ساخته است. به نحوی که در مطالعه موضوعاتی همچون تعیین نظم فضایی، اندازه گیری درصد مونومر در کوپلیمرها، اندازه گیری مقدار پیوند خوردن، تعیین وزن مولکولی، بررسی سازوکار واکنش ها و مطالعه سینتیکی استفاده می شود. مهم ترین عناصر موجود در پلیمرها هیدروژن و کربن هستند که بیشتر پژوهش ها بر اساس آن ها انجام شده است. اما در ساختار پلیمرهای بی شماری اتم های نیتروژن، اکسیژن، فسفر، فلئور و سیلیسیم نیز وجود دارد و در موارد خاصی مطالعات روی آن ها به وسیله NMR انجام شده است. طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته، مطالعه مولکول از راه تابش امواج الکترومغناطیسی در محدوده بسامد رادیویی روی هسته اتم هایی است که قابلیت مغناطیس شدن دارند. این روش همانند سایر روش های طیف سنجی، شامل برهم کنش امواج الکترومغناطیسی با ماده است، با این تفاوت که در رتبه بندی امواج الکترومغناطیس، در کمترین مقدار انرژی و بیشترین مقدار طول موج قرار دارد (ضیائی، 1392).

به وسیله NMR می توان به اطلاعات دقیق ساختاری از کربوهیدرات ها مانند شناسایی ترکیب مونوساکارید، مشخص کردن آلفا یا بتا بودن کربن آنومری و توالی واحدهای قند در الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها دست یافت. هر پلی ساکارید طیف منحصر به فردی در اسپکتروسکوپی ^{13}C و ^1H در NMR دارد. در طیف پروتون جابجایی شیمیایی تمام مشتقات کربوهیدرات مانند مونو، الیگو و پلی ساکارید در محدوده 1 تا 6 ppm قرار دارند. پروتون های آنومری هر مونوساکارید بسته به آلفا یا بتا بودن، سیگنال های قابل تشخیص می دهند. اما به دلیل همپوشانی سیگنال ها، تعیین ساختار پلی ساکاریدها تنها به وسیله طیف پروتون دشوار است (Cui, 2005). تصویری از جابجایی شیمیایی پروتون کربوهیدرات ها در شکل 1-12 ارائه شده است.

هسته کربن-13 در مقایسه با پروتون دارای حساسیت و فراوانی کمتری است، ولی به علت گسترده بودن دامنه تغییرات شیمیایی این امتیاز را دارد که مطالعه دقیق تری به وسیله آن انجام داد. موقعیت جابجایی شیمیایی هر کربن همانند پروتون به گروه های الکترون دهنده و الکترون کشنده وابسته است (ضیائی، 1392). موقعیت جابجایی شیمیایی کربن کربوهیدرات ها در شکل 1-13 آمده است.



شکل 1-12: جابجایی شیمیایی پروتون در کربوهیدرات ها (Cui, 2005)



شکل 1-13: جابجایی شیمیایی کربن در کربوهیدرات ها (Cui, 2005)

6-1- بررسی خاصیت ضد اکسندگی

اکسیداسیون در سیستم های بیولوژیکی و پلی مرهای مصنوعی موجب تخریب سیستم می شود که این فرایند مربوط به رادیکال های آزاد شده از واکنش های زنجیری می باشد. رادیکال هیدروکسیل (OH^\cdot), رادیکال آلکوکسی (RO^\cdot) و رادیکال پراکسی (ROO^\cdot) از رادیکال های حد واسط واکنش پذیر مهمی هستند که در طول واکنش های اکسیداسیون تشکیل می شوند. ضد اکسنده ها قادر به مهار رادیکال های حدواسط تشکیل شده در طی اکسیداسیون هستند (فاضلی، 1395). روش های مختلفی برای بررسی و تخمین کارایی ضد اکسنده ها وجود دارد. برای مثال روش هایی مانند به دام اندازی رادیکال های آزاد DPPH¹ و هیدروکسیل و سوپراکسید برای بررسی خاصیت ضد اکسندگی مورد استفاده قرار می گیرند و معمولا اسید آسکوربیک به عنوان کنترل در نظر گرفته می شود (Yin *et al.*, 2017).

¹ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

1-7- گیاه شکر تیغال^۱

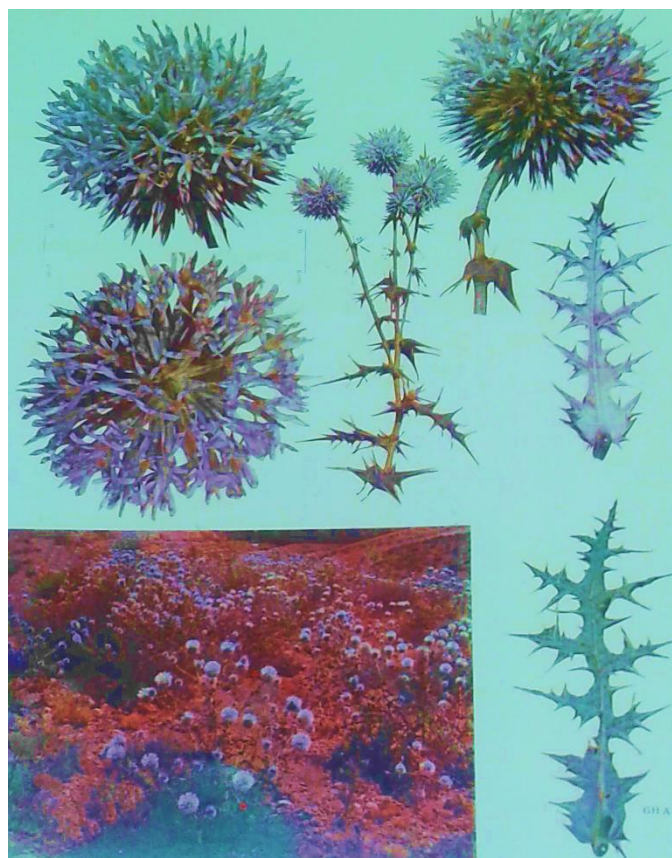
جنس شکر تیغال از خانواده آفتابگردان^۲ است که تاکنون 350 گونه آن از سراسر جهان گزارش شده و بر اساس فلور ایرانیکا، 54 گونه از جنس شکر تیغال در نقاط مختلف ایران پراکنش دارد. گونه های متعدد جنس شکر تیغال اغلب در نقاط تخریب یافته، اراضی زراعی رها شده و خاکریزهای کناره های جاده ها و گاهی در نقاط بکر و کوهستانی می رویند (مظفریان، 1380). مان شکر تیغال در اثر فعالیت یک گونه حشره سر خرطومی با نام علمی *vulpes Oliv. Larinus* روی بعضی از گونه های جنس شکر تیغال به دست می آید. حشره مولد مان روی کلیه گونه های شکر تیغال فعالیت دارد اما تنها در چهار گونه قادر به تولید مان است. بررسی های گیاه شناختی، مورفولوژیکی و رویشگاهی مشخص کرد که گونه های مولد مان کپه گل کروی دارد، از نظر طول ساقه یکسان و از نظر شرایط رویشگاهی در شرایط مشابهی رویش دارند. محل تشکیل مان روی قاعده برگ است و مراحل زندگی حشره شامل سنین مختلف لاروی، شفیرگی و حشره کامل در درون کپسول که همان مان شکر تیغال است طی می شود (نصیرزاده و همکاران، 1384).

شکر تیغال سفالوتس^۳ گونه ای از جنس شکر تیغال به ارتفاع 80-30 cm است. تمام گیاه، تار عنکبوتی با کرک های سفید رنگ است. برگ های بسیار بزرگ، ضخیم و با دندانه های منتهی به خاری بلند دارد. گل آن آبی کم رنگ یا سفید متمایل به آبی و به صورت توده ای به قطر 8-10 cm است. موسم گلدهی آن خرداد-تیر است و در مناطق اصفهان، تهران، همدان، قم، قزوین، گرمسار، شاهرود، بسطام و کرج می روید (قهرمان، 1361). تصویر شکر تیغال سفالوتس در شکل 1-14 نمایش داده شده است.

¹ Echinops

² Asteraceae

³ *Echinops cephalotes* DC



شکل 1-14: شکر تیغال سفالوتس (قهرمان، 1361)

1-7-1- اثرات درمانی شکر تیغال

شکر تیغال به عنوان گونه ای پیچیده از تیوفن های استیلنی محسوب می شوند. از جمله ترکیبات ویژه در شکر تیغال می توان به سسکیوترپین لاکتون¹، آلکالوئید، لیگنان، فلاونوئیدها و هیدروکسیسینامات² اشاره کرد (Senejoux *et al.*, 2013). فرآورده نسبتاً شیرینی که به صورت طبیعی یا در اثر فعالیت حشرات از برگ، پوست، شاخه یا در اثر شکافتن تنه بعضی از درختان به بیرون تراوش می کند را مان می نامند. در ایران هفت نوع مان مهم از جمله گز خوانسار، گز علفی، شیرخشت، ترنجبین، بید خشت، شکر سرخ و شکر تیغال وجود دارد (نصیرزاده و همکاران،

¹ Sesquiterpene Lactone
² Hydroxycinnamate

1384). ساختار مان حاوی سلولز، نشاسته، مواد آلبومینوئیدی، مقدار جزئی چربی و مقدار زیادی (حدود 25٪) قند ترهالوز است. طعمی شیرین دارد و لعابدار است و به عنوان برطرف کننده سرفه و تحریک دستگاه تنفسی تحتانی، تب بر، نرم کننده دستگاه گوارش و طعم دهنده در طب سنتی کاربرد وسیعی دارد. شکر تیغال به واسطه اثرات ضد اکسندگی ترهالوز، به عنوان یک ضد سرطان به کار می رود (تکاور و همکاران، 1387). شکر تیغال فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی نیز دارد (Khadim et al., 2014). عصاره متانولی ریشه شکر تیغال اچیناتوس روکس¹ حاوی کربوهیدرات ها، استروئیدها، گلیکوزیدهای ترپنوئیدی، فنولیک و تانن است که اثر ضد دیابتی و ضد اکسندگی بالایی دارند (Sarvaiya et al., 2017).

2-7-1- سمیت شکر تیغال

به دلیل استفاده مداوم از حشره کش ها، پشه ها در برابر مواد شیمیایی مقاوم می شوند و مدیریت جمعیت انبوه پشه ها دشوار است. استفاده از آفت کش های مصنوعی سلامت انسان و محیط زیست را به خطر می اندازد. از این رو آفت کش های طبیعی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. گیاهان منبع غنی از ترکیبات زیست فعال هستند. تیوفن ها² از مشتقات گونه های شکر تیغال هستند که سمیت شدیدی در برابر حشرات، گیاهان و بیماری های قارچی گیاهان دارند (Nakano et al., 2014). در پژوهشی 8 نوع مشتقات تیوفن از ریشه و اندام های هوایی چهارگونه شکر تیغال *E. albicaulis*، *E. transiliensis*، *E. ritro* و *E. spinosissimus subsp. spinosissimus* جداسازی شد که خواص کشندگی و مهارکنندگی آفت موربانه زیرزمینی را داشت (Fokialakis et al., 2006).

¹ *Echinops echinatus roxb*

² Thiophenes

فصل دوم

بررسی منابع

2-1- استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها

هزاران سال است که گیاهان و ترکیبات زیست فعال آن ها مورد استفاده قرار می گیرند. طب گیاهی در سالیان متمادی از گیاهان و عصاره های آن ها برای درمان بیماری های انسان و حیوان استفاده کرده است. شیوع بیماری های غیرعفونی، در دوران قبل از مدرنیته در جامعه کم بوده است که بخشی از آن را به علت حضور مواد شیمیایی حفاظتی در گیاهان می دانند. به همین دلیل توجه محققین به استخراج ترکیبات زیست فعال از منابع گیاهی معطوف شده است (Vidanarachchi *et al.*, 2009).

طبق مطالعات انجام شده در مدل سیستم های آزمایشگاهی یا مدل های انسانی و حیوانی، پلی ساکاریدهای استخراج شده از منابع گیاهی اثرات ضد ویروسی، تقویت سیستم ایمنی، ضد سرطانی، ضد اکسندگی، محافظت کبدی، ضد لخته کنندگی، ضد التهابی، فعالیت خون سازی و پریبیوتیکی دارند (Jin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). به همین دلیل استخراج و شناسایی ساختار پلی ساکاریدهای زیست فعال از منابع جدید از موضوعات به روز بسیاری از محققین است.

در سال 2019 بیگی¹ و همکاران هتروپلی ساکارید ریشه های سریش تماشایی بختیاری² را با استفاده از آب 60° C استخراج و با ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز ۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ خالص سازی کردند (Beigi *et al.*, 2019).

¹ Beigi

² *Eremurus sepectabilis M. B. subsp. spectabilis*

در سال 2018 هوآنگ^۱ و همکاران توانستند هتروپلی ساکاریدی از باقیمانده استخراج با آب گیاه سرخس پشمین^۲ استخراج کنند. برای خالص سازی پلی ساکارید از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز 52 و سفادکس جی-75 استفاده شد (Huang et al., 2018).

هو^۳ و همکاران در سال 2018 پلی ساکارید محلول در آب ساقه گیاه اکانتوپانکس لوکورایزس^۴ را با استفاده از آب 80°C استخراج کردند و سپس با ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز 52 و سفادکس جی-100 خالص سازی کردند (Hu et al., 2018).

جهان بین در سال 2018 پلی ساکارید محلول در آب ریشه های گیاه چوبک سوزنی^۵ را با استفاده از آب گرم 50°C استخراج کرد. برای خالص سازی پلی ساکارید از ستون های کروماتوگرافی تبادل آنیونی دی اتیل آمینو اتیل سلولز 52 و کروماتوگرافی فیلتر ژلی سفادکس جی-50 استفاده شد (Jahanbin, 2018).

صحراگرد و همکاران در سال ۲۰۱۷ هتروپلی ساکاریدی اسیدی ریشه های تمشک برگ نارونی^۶ را با استفاده از آب 70°C استخراج و با ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز ۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ خالص سازی کردند (Sahragard et al., 2017).

هی^۷ و همکاران در سال 2017 یک هتروپلی ساکارید محلول در آب از عصاره آبی اسکروتیا قارچ پلی پوروس آمبلیتس^۸ استخراج و با ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سفاروز و سفاکریل S-200 خالص سازی کردند (He et al., 2017).

¹ Huang
*Cibotium barometz*²

³ Hu

⁴ *Acanthopanax leucorrhizus*

⁵ *Acanthophyllum acerosum*

⁶ *Rubus anatolicus*

⁷ He

⁸ *Polyporus umbellatus*

لی^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تحقیقاتشان به پلی ساکاریدی ضد انعقادی در جلبک دریایی سبز مونوستروما انجیکاوا^۲ دست یافتند. خالص سازی پلی ساکارید با ستون های کروماتوگرافی تبادل یونی و اندازه-طردی انجام گرفت (Li *et al.*, 2017).

ژانگ^۳ و همکاران در سال 2016 پلی ساکاریدی محلول در آب از ریشه های سنبل ختایی^۴ که گیاهی دارویی در طب سنتی چین است، استخراج و آن را با استفاده از کروماتوگرافی فیلتر ژلی سفادکس جی-۵۰۰ خالص سازی کردند (Zhang *et al.*, 2016).

در سال ۲۰۱۶ ما^۵ و همکاران به منظور استخراج پلی ساکارید از ریشه سفالروکارپوس گراسیلیس^۶ از آب ۶۰°C تا ۱۰۰°C استفاده کردند. پس از سانتریفیوژ عصاره، مواد ترسیب شده با استفاده از خشک کن دورانی تحت خلأ در دمای ۶۵°C تغلیظ شدند (Ma *et al.*, 2016).

در سال ۲۰۱۶ کلسی^۷ و همکاران با تحقیق روی ریشه گیاه سیمودوسا نودوسا^۸ موفق به استخراج پلی ساکاریدهای آن با استفاده از آب ۹۰°C تا ۹۵°C به مدت ۳ تا ۴ ساعت طی ۳ مرحله شدند. پس از صاف کردن عصاره حاصل، ترسیب توسط اتانول در دمای ۴°C انجام شد. به منظور جداسازی پلی ساکاریدهای سولفات‌ها این گیاه از کروماتوگرافی مایع تبادل یون استفاده شد (Kolsi *et al.*, 2016).

¹ Li

² *Monostroma angicava*

³ Zhang

⁴ *Angelica sinensis*

⁵ Ma

⁶ *Sphallerocarpus gracilis*

⁷ Kolsi

⁸ *Cymodosea nodosa*

یوان^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۵ موفق به استخراج پلی ساکارید های برگ درخت توت سیاه^۲ با استفاده از آب ۹۲°C به مدت ۳/۵ ساعت شدند. خالص سازی پلی ساکاریدها توسط ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز انجام گرفت (Yuan *et al.*, 2015).

ژانگ^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی ساکاریدی محلول در آب از تفاله گیاه سیسال^۴ با استفاده از آب داغ ۸۰°C استخراج کردند. خالص سازی این پلی ساکارید با ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفاکریل S-300 صورت گرفت (Zhang *et al.*, 2014).

کرم^۵ و همکاران در سال 2012 توانستند از ترهالامانا^۶ پلی ساکارید محلول در آب استخراج کنند و برای خالص سازی از کروماتوگرافی تبادل آنیونی و فیلتر ژلی استفاده کردند (Karam *et al.*, 2012).

گوآن^۷ و همکاران در سال 2011 دو پلی ساکارید از گل چای^۸ با استفاده از آب 80°C استخراج و با ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-100 خالص سازی کردند (Quan *et al.*, 2011).

در سال ۲۰۱۱ زیبا^۹ و همکاران موفق به شناسایی مونوساکاریدهای حاصل از هتروپلی ساکارید استخراج شده از ساقه های افدرا سینیکا^{۱۰} شدند. آن ها پس از چربی زدایی از ساقه ها با استفاده از اتانول ۹۵٪، مرحله استخراج عصاره آبی را به مدت ۲۴ ساعت توسط آب یون زدایی شده انجام دادند. پروتئین زدایی با استفاده از کلروفرم و بوتانول با نسبت ۵ به ۱ بر اساس روش سواگ صورت گرفت. در نهایت پلی ساکارید

¹ Yuan

² *Morus alba*

³ Zhang

⁴ *Sisal*

⁵ Karam

⁶ *Trehala Manna*

⁷ Quan

⁸ *Tea (Camellia sinensis) Flower*

⁹ Xia

¹⁰ *Ephedra sinica*

ها پس از رسوب با اتانول به مدت ۴۸ ساعت، با استفاده از ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سفاروز خالص سازی شدند (Xia et al., 2011).

در ادامه به تحقیقات انجام شده در حوزه استخراج پلی ساکاریدهای جنس شکر تیغال اشاره می شود: بین^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی ساکارید ضد مکملی را از ریشه گیاه شکر تیغال لاتیفولیس تاچ^۲ با کمک آب داغ استخراج کردند. این پلی ساکارید به کمک آنالیزهای شیمیایی و طیفی مورد بررسی قرار گرفت. وزن مولکولی متوسط این پلی ساکارید ۱۱۸۰۰۰ دالتون بود (Bin et al., 2014). هوروث^۳ و همکاران در سال ۱۹۹۸ پلی ساکاریدهای ریشه و ساقه پنج گونه از جنس شکر تیغال شامل *Sphaerocephalus*, *Ruthenicus*, *Exaltatus*, *Commutatus*, *Orientalis* را استخراج کردند. در چین عصاره استخراج شده از این گیاهان به عنوان داروی ضد تومور و ضد التهاب مورد استفاده قرار می گیرد. در این پژوهش نقش پلی ساکاریدهای موجود در عصاره برای فعالیت های زیستی ضد توموری و ضد التهابی مورد بررسی قرار گرفت (Horvath et al., 1998).

2-2- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها

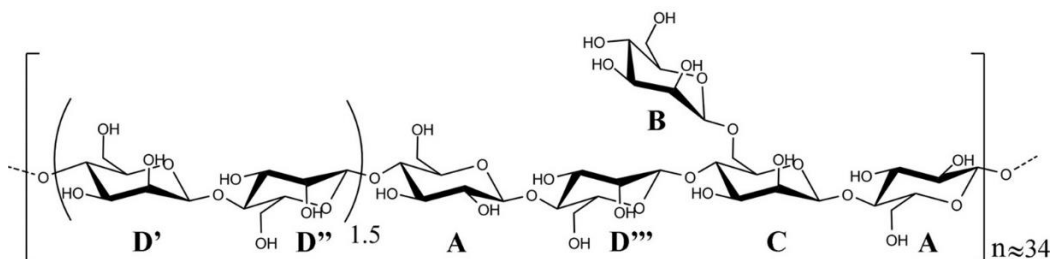
بیگی و همکاران در سال 2019 با انجام تحقیقاتی روی ریشه های گیاه سریش تماشایی بختیاری پلی ساکارید محلول در آب به نام ESP استخراج کردند. نتایج آنالیزهای متیلاسیون، هیدرولیز ناقص اسیدی، تجزیه اسمیت، اکسیداسیون پرپودات، GLC-MS و NMR تک/دو بعدی نشان داد که پلی ساکارید حاوی

¹ Bin

² *Echinops latifolius tausch*

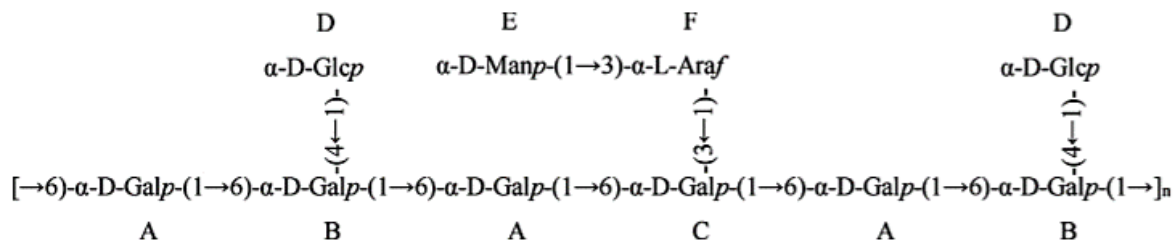
³ Horvath

واحدهای گلوکز و مانوز با نسبت های مولی 1، 2/9 با درجه چرخش نوری $36/3^\circ$ - و وزن مولکولی 43/8 کیلودالتون است (شکل 1-2) (Beigi *et al.*, 2019).



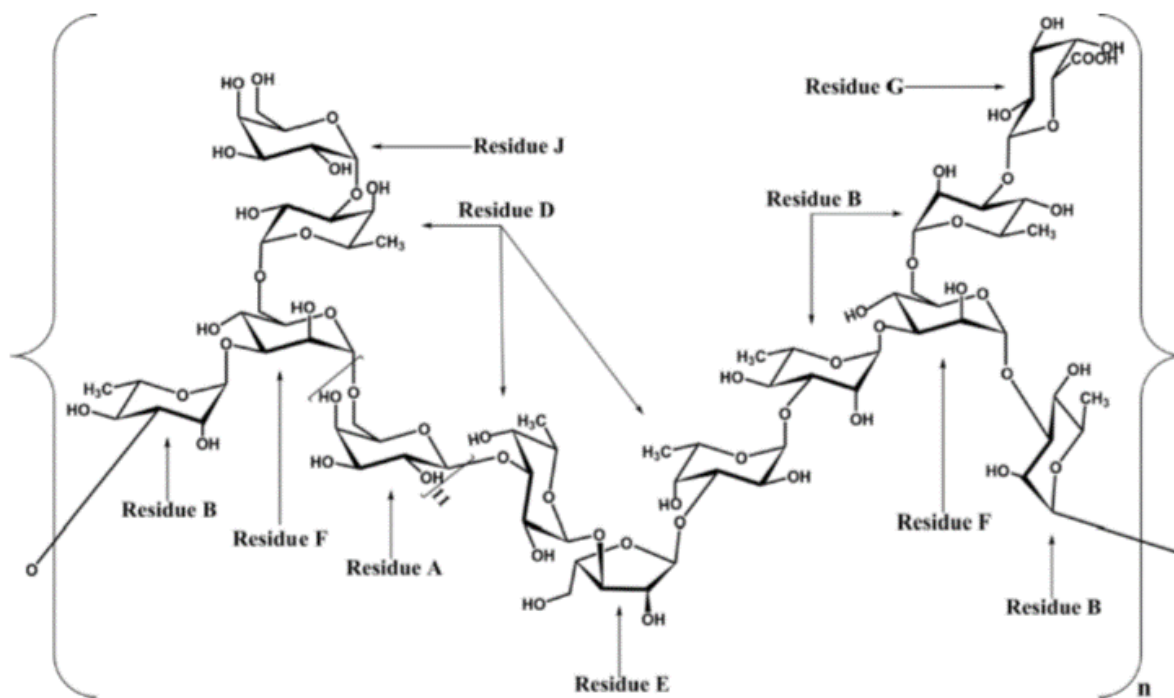
شکل 1-2: واحدهای سازنده پلی ساکارید ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری (Beigi *et al.*, 2019).

هو و همکاران در سال 2018 آزمایشاتی روی پلی ساکارید جدید ساقه گیاه اکانتوپانکس لوکورایزس انجام دادند. ساختار پلی ساکارید با نام ALP-1 (شکل 2-2) با استفاده از HPLC، HPGPC، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پرپودات، تجزیه اسمیت، متیلاسیون، همراه با تجزیه و تحلیل طیف های IR، UV و NMR تعیین و مشخص شد. این پلی ساکارید از واحدهای گالاکتوز، گلوکز، مانوز و آرابینوز با نسبت های مولی 6/1:2/1:1/1:1/0 تشکیل شده بود. شاخه اصلی پلی ساکارید از 6→1-آلفا - دی - گالاکتوپیرانوزیل و زنجیرهای جانبی از آلفا - دی - مانوپیرانوزیل 1←3-آلفا - ال - آرابینوفورانوز در کربن شماره 3 و آلفا - دی - گلوکوپیرانوزیل در کربن شماره 4 تشکیل شده بود. وزن مولکولی این پلی ساکارید 169 کیلودالتون برآورد شد (Hu *et al.*, 2018).

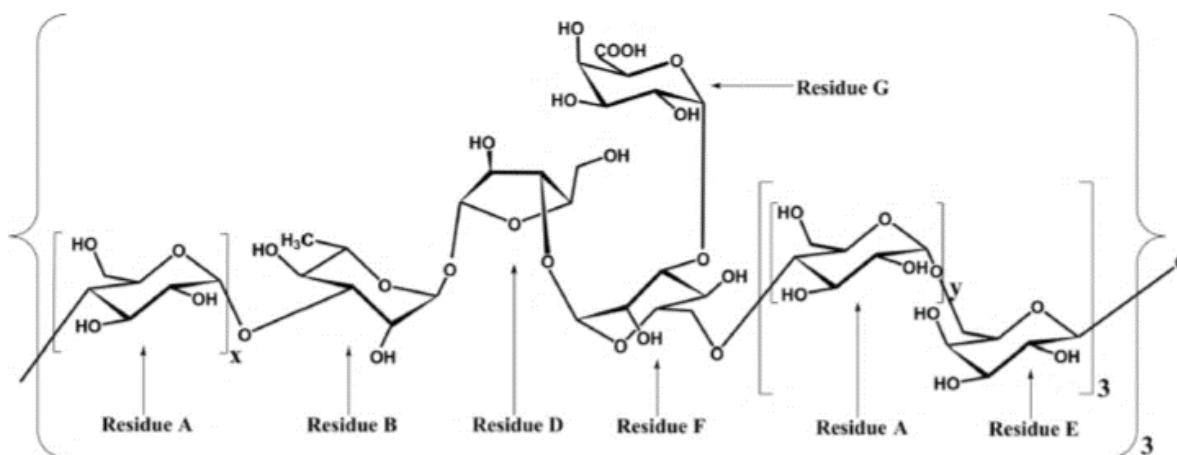


شکل 2-2: واحدهای سازنده پلی ساکارید ساقه گیاه اکانتوپانکس لوکورایزس (Hu *et al.*, 2018)

هوآنگ و همکاران در سال 2018 مطالعه ای روی ساختار هتروپلی ساکاریدی گیاه سرخس پشمین انجام دادند. این گیاه گرمسیری است که عمدتاً در شبه جزیره مالزی و جنوب چین رشد می کند. دو پلی ساکارید با نام های CBBP-2 و CBBP-3 از این گیاه استخراج شد که ساختار این پلی ساکاریدها با روش های شیمیایی و NMR تعیین و مشخص شد. پلی ساکارید CBBP-2 از واحدهای $\leftarrow 4$ آلفا - دی - گلوکوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 3$ آلفا - ال - رافینوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 3$ آلفا - ال - آرابینوفورانوز - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 6$ - بتا - دی - گالاکتوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 3$ و $\leftarrow 6$ آلفا - دی - مانوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، پلی ساکارید CBBP-3 از واحدهای $\leftarrow 6$ - بتا - دی - گالاکتوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 3$ آلفا - ال - رافینوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 3$ آلفا - ال - فوکوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 3$ آلفا - ال - آرابینوفورانوز - (1 \leftarrow)، $\leftarrow 3$ و $\leftarrow 6$ آلفا - دی - مانوپیرانوزیل - (1 \leftarrow)، بتا - دی - گالاکتوپیرانوزیل - (1 \leftarrow) و آلفا - دی - گالاکتوپیرانوزیل - (1 \leftarrow) تشکیل شده بود. وزن مولکولی CBBP-2 $10/7$ کیلودالتون و CBBP-3 $1/23 \times 10^2$ کیلودالتون بود (شکل 2-3 و 2-4) (Huang *et al.*, 2018).

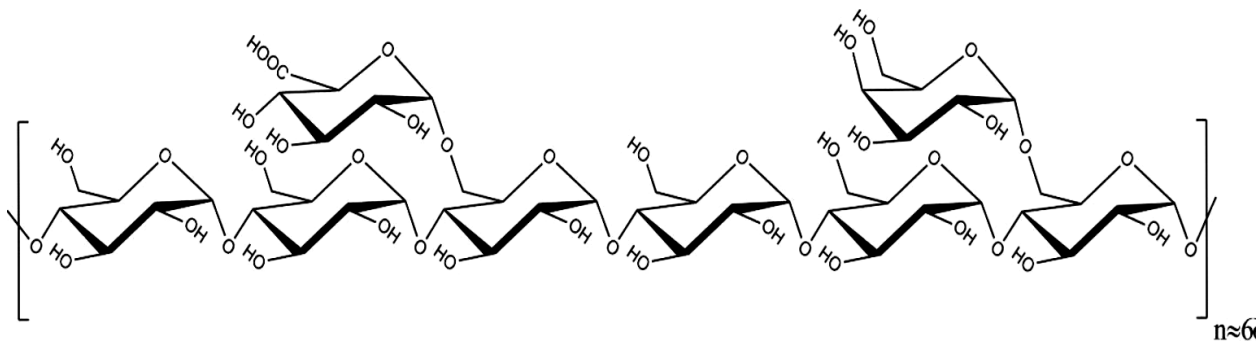


شکل 2-3: واحدهای سازنده CBBP-3 گیاه سرخس پشمین (Huang *et al.*, 2018)



شکل 2-4: واحدهای سازنده CBBP-2 گیاه سرخس پشمین (Huang *et al.*, 2018)

صحراگرد و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعاتی روی ساختار پلی ساکارید محلول در آب ریشه های گیاه تمشک برگ نارونی انجام دادند. همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص به وسیله کروماتوگرافی غریبال مولکولی با کارایی بالا تعیین شد. ساختار پلی ساکارید خالص نیز بر اساس درجه چرخش نوری، واحدهای مونومری سازنده، متیله کردن، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت، طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته و مادون قرمز مشخص شد. نتایج آزمایشات نشان داد که پلی ساکارید ریشه های تمشک برگ نارونی یک هتروپلی ساکارید اسیدی حاوی گلوکز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک به نسبت های مولی به ترتیب 6/2، 1/0 و 1/2 با درجه چرخش نوری $+196^{\circ}$ و میانگین وزن مولکولی 7900 دالتون است. زنجیر اصلی پلی ساکارید خالص ریشه های تمشک برگ نارونی از واحدهای گلوکوپیرانوز با اتصالات α (1 \rightarrow 4) تشکیل شده و در محل کربن شماره 6 گلوکز شاخه های جانبی آلفا - دی - گالاکتوپیرانوز (1 \leftarrow) و اسید آلفا - دی - گلوکورونیک (1 \leftarrow) قرار گرفته است (شکل 2-5) (Sahragard *et al.*, 2017).

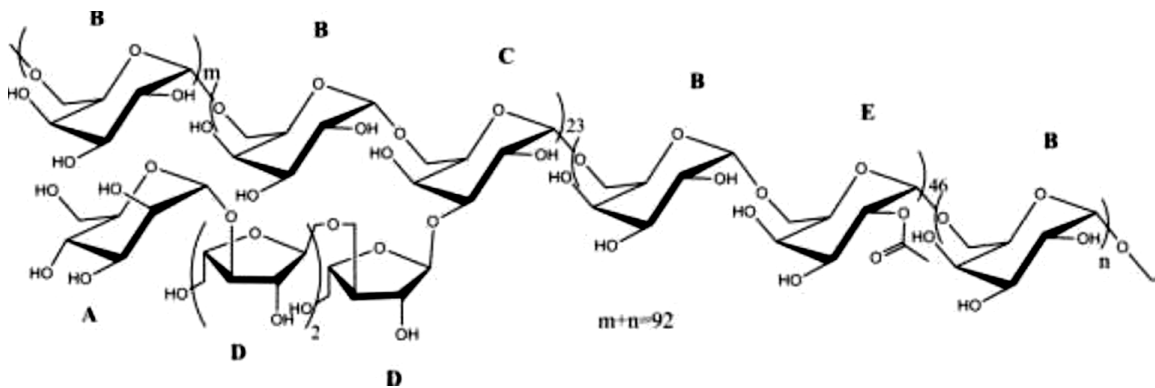


شکل 2-5: ساختار پلی ساکارید ریشه گیاه تمشک برگ نارونی (Sahragard *et al.*, 2017)

جهان بین و همکاران در سال 2017 با انجام تحقیقاتی روی ریشه های گیاه سریش استنوفیلوس بیکر¹ یک پلی ساکارید جدید محلول در آب به نام ES-1 استخراج کردند. نتایج آنالیز های FT-IR، متیلاسیون،

¹ *Eremurus stenophyllus* (boiss. and buhse) baker

GC-MS، اکسیداسیون پرودات، تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی و NMR نشان داد که پلی ساکارید از واحدهای گالاکتوز، آرابینوز و مانوز با نسبت های مولی 1،3،10 تشکیل شده است و اسکلت اصلی از اتصال 6←1-آلفا-دی-گالاکتوپیرانوزیل و شاخه ها در کربن شماره 3 از آلفا-دی-مانوپیرانوزیل- (3←1)-آلفا-ال-آرابینوفورانوز-(3←1)-آلفا-ال-آرابینوفورانوز-(3←1)-آلفا-ال-آرابینوفورانوز- (3←1) تشکیل شده بودند (شکل 6-2) (Jahanbin et al., 2017).



شکل 6-2: ساختار پلی ساکارید ریشه گیاه سریش استنوفیلوس بیکر (Jahanbin et al., 2017)

لیو^۱ و همکاران در سال 2017 پلی ساکاریدی اسیدی از تفاله سارکاندرا گلابرا^۲ جدا کردند. آن ها پلی ساکارید را به وسیله رنگ زدایی و کروماتوگرافی تبادل یونی خالص سازی و ساختار آن را با HPLC، HPSEC/MALLS، FT-IR و NMR تعیین کردند. پلی ساکارید شامل اسید 4 و 1-آلفا-دی-گالاکتورونیک، 5 و 1-آلفا-ال-آرابینوز، 3 و 1-بتا-دی-گالاکتوز، 4 و 1-آلفا-دی-گلوکز، 6 و 4 و 1-بتا-دی-گلوکز، 6 و 1-بتا-دی-گلوکز، 2 و 1-آلفا-رامنوز با وزن مولکولی $4/208 \times 10^4$ دالتون بود (Liu et al., 2017).

¹ Liu

² *Sarcandra glabra*

فتحی^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۶ طبق مطالعات انجام داده روی صمغ درخت آلبالو^۲ قندهای ال آرابینوز، دی گالاکتوز، زایلوز، مانوز و رامنوز با نسبت های مولی ۵/۶۹، ۱۷/۶۳، ۲۱/۳۱، ۲۴/۰۴، ۳۱/۳۱ شناسایی کردند. آن ها ساختار پلی ساکارید صمغ را با استفاده از دستگاه NMR، آرابینوگالاکتان پیشنهاد دادند (Fathi *et al.*, 2016).

شعبانی^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۶ صمغ درخت گیلاس^۴ را مورد مطالعه قرار دادند. آن ها دریافتند که پلی ساکارید صمغ از واحدهای مانوز، آرابینوز، گالاکتوز و زایلوز با نسبت های مولی ۲/۴، ۷/۱، ۱۴/۷، ۱/۰ تشکیل شده بود که ۱۴۶ کیلودالتون وزن داشت (Shabani *et al.*, 2016).

بوآزیز^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۴ به هتروپلی ساکارید صمغ درخت بادام^۶ با واحدهای تشکیل دهنده گالاکتوز، آرابینوز، زایلوز، مانوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک دست یافتند که با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، وزن مولکولی هتروپلی ساکارید ۹۹/۳ کیلودالتون تعیین گردید (Bouaziz *et al.*, 2014).

گو^۷ و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تحقیقاتشان به پلی ساکاریدی از بذر درمنه^۸ دست یافتند که ساختار آن را به کمک هیدرولیز اسیدی، تجزیه متیلاسیون، طیف سنجی NMR 1D,2D و MALDI-TOF-MS تعیین کردند. زنجیر اصلی آن از دی-مانوزپیرانوزیل 1 به 4 و دی-گلوکوپیرانوزیل 1 به 4 با نسبت های مولی 3، 1، 1 تشکیل شده بود (شکل ۲-۷) (Guo *et al.*, 2012).

¹ Fathi

² *Prunus cerasus*

³ Shabani

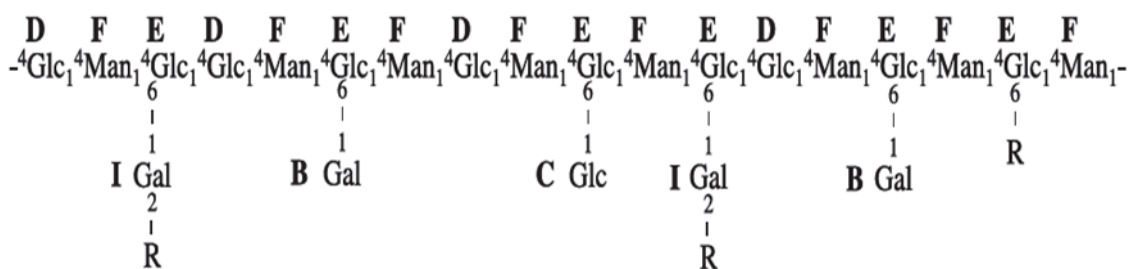
⁴ *Prunus avium*

⁵ Bouaziz

⁶ *Prunus amygdalus*

⁷ Guo

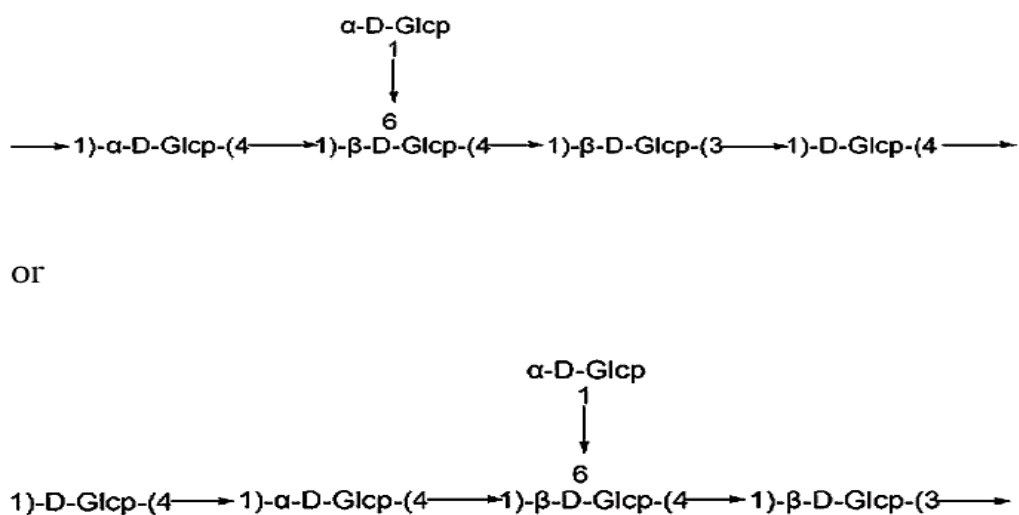
⁸ *Artemisia sphaerocephala* Krasch



شکل 2-7: ساختار پلی ساکارید بذر درمنه (Guo *et al.*, 2012)

یو¹ و همکاران در سال 2010 روی پلی ساکارید ضد تومور از بازیدیوکارپ قارچ شیتاکه² تحقیق کردند. وزن مولکولی آن با کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا 642 کیلودالتون برآورد شد. مطالعات شیمیایی

و اسپکتروسکوپی نشان داد که زنجیر اصلی از 1 به 4 و 1 به 3 گلوکوپیرانوزیل تشکیل شده است (شکل 2-8) (Yu *et al.*, 2010).



شکل 2-8: ساختار پلی ساکارید قارچ شیتاکه (Yu *et al.*, 2010)

¹ Yu
² *Lentinus edodes*

دانگ^۱ و همکاران در سال 2010 سه پلی ساکارید خنثی، اسیدی و پکتیکی از خرفه پرپهن^۲ جدا کردند. پلی ساکارید خنثی شامل گلوکز، مانوز، آرابینوز با مقدار کمی گالاکتوز بود. پلی ساکارید اسیدی عمدتاً از گالاکتوز، آرابینوز و مقدار کمی اسید گلوکورونیک تشکیل شده بود. پلی ساکارید پکتیکی عمدتاً شامل اسید گالاکتورونیک با مقدار اندکی گالاکتوز، رامنوز و آرابینوز بود. وزن مولکولی پلی ساکارید خنثی، اسیدی و پکتیکی به ترتیب $8/3 \times 10^3$ ، $5/8 \times 10^3$ و $8/7 \times 10^3$ کیلودالتون محاسبه شد. آنالیز متیلاسیون در این تحقیق نشان داد که پلی ساکارید خنثی شامل 1و4-مانوپیرانوزیل (34/9٪)، 1و4-گلوکوپیرانوزیل (22٪)، 1و2و4-گلوکوپیرانوزیل (10/2٪)، 1و4و6-مانوپیرانوزیل (1/9٪)، 1و4و6-گلوکوپیرانوزیل (0/5٪) در انتها به گالاکتوپیرانوزیل (1/8٪) متصل شده است. پلی ساکارید اسیدی از 1و3-گالاکتوپیرانوزیل (14/5٪)، 1و3و6-گالاکتوپیرانوزیل (28/4٪)، 1و6-گالاکتوپیرانوزیل (12٪)، 1و5-آرابینوفورانوزیل (7/8٪)، 1و3-آرابینوفورانوزیل (1/7٪)، آرابینوفورانوزیل (22/3٪) و گالاکتوپیرانوزیل (6/5٪) تشکیل شده است (Dong et al., 2010).

سیماز^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۸ در تحقیقاتشان روی صمغ تنه و میوه درخت هلو^۴ قندهای آرابینوز، زایلوز، مانوز، گالاکتوز و اسیدهای ارونیک را در هر دو شناسایی کردند. وزن مولکولی صمغ میوه هلو را $6/43 \times 10^6$ گرم بر مول تخمین زدند (Simas et al., 2008).

روسیک^۵ و همکاران در سال ۱۹۶۶ پلی ساکارید صمغ درخت آلبالو را استخراج کردند. نتایج آزمایشات نشان داد که پلی ساکارید اسیدی صمغ حاوی آرابینوز، زایلوز، گالاکتوز، رامنوز، مانوز و اسید گلوکورونیک با وزن مولکولی ۶۶۰۰۰۰ دالتون و درجه چرخش نوری $-13/6^\circ$ بود (Rosik et al., 1966).

¹ Dong

² *Portulaca oleracea L.*

³ Simas

⁴ *Prunus persica*

⁵ Rosik

با وجود مطالعات بسیار پیرامون استخراج و شناسایی ساختار پلی ساکاریدهای گیاهی، تاکنون تحقیقات گسترده ای پیرامون پلی ساکاریدهای خانواده آفتابگردان، خصوصاً جنس شکر تیغال صورت نگرفته است و بیشتر مطالعات انجام شده در رابطه با خواص دارویی ترکیبات استخراج شده از جنس شکر تیغال مانند خاصیت ضد اکسندگی، ضد میکروبی و ضد قارچی است (Erenler *et al.*, 2013; Toroglu *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 1988). پژوهش های انجام شده در رابطه با شناسایی و بررسی ساختار پلی ساکاریدهای این جنس بسیار محدود و اندک است.

بین و همکاران در سال 2014 پلی ساکاریدی را از ریشه گیاه شکر تیغال لاتیفولیس تاچ با کمک آب داغ استخراج کردند و EPS-2A نامیدند. این پلی ساکارید به کمک آنالیز متیلاسیون و NMR مورد بررسی قرار گرفت و ساختار آن پلی-(1←4) - اسید-آلفا-دی- گالاکتورونیک تعیین شد (Bin *et al.*, 2014).

فصل سوم

مواد و روش ها

1-3- مواد اولیه و محلول های شیمیایی

1-1-3- جمع آوری نمونه

ریشه های گیاه شکر تیغال سفالوتس در خرداد ماه سال 1397 از پارک جنگلی لتمان کن¹ واقع در شمال غربی تهران (دامنه البرز) جمع آوری و در تماس با هوا خشک شدند (شکل 1-3).



شکل 1-3: گیاه شکر تیغال سفالوتس.

پس از شناسایی گیاه توسط گیاه شناس معروف آقای دکتر ولی الله مظفریان، ریشه های گیاه با قطر حدود 0/5-3 سانتی متر جمع آوری و در تماس با هوا و در دمای محیط خشک شدند. در ادامه خاک و مواد زائد از ریشه های اصلی جدا شدند. سپس ریشه ها به تکه های کوچکتر با اندازه حدود 1 سانتی متر برش خوردند. برای اینکه استخراج به آسانی، کارآمدتر و سریع تر انجام شود ریشه ها با هاون به شکل پرک در آورده شدند (شکل 2-3).

¹ Latmal kan



شکل 3-2: ریشه های خرد شده و ریز شکر تیغال سفالوتس.

2-1-3- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده

دی اتیل آمینو اتیل سلولز، سفادکس جی-100، دکستران با وزن های مولکولی 5000-200/000 دالتون از شرکت فارماسیا¹(اپسالا²) سوئد تهیه شدند. استانداردهای مورد استفاده مونوساکاریدهای خالص (د-مانوز، د-گلوکز، د-گالاکتوز، د-زایلوز، اسید-د-گلوکورونیک، ال-رامنوز، ال-آرابینوز، اسید-ال-گالاکتورونیک)،

¹ Pharmacia
² Uppsala

¹DPPH ²DMSO و ³DSS از شرکت های سیگمای⁴ آمریکا و مرک⁵ آلمان خریداری شدند. اسیدتری فلورواستیک و اسید آسکوربیک از شرکت های فلوکا⁶ و سیگمای آمریکا تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد نیاز مانند انواع اسیدها، بازها و غیره درجه خلوص آزمایشگاهی داشتند. کل محلول های آبی مورد نیاز با استفاده از آب مقطر تهیه شدند.

3-1-3- دستگاه های مورد استفاده

دستگاه سانتریفیوژ با ظرفیت حجمی بالا (1لیتر) ساخت شرکت اپندورف⁷ آلمان و ترازوی دیجیتال با دقت 0/001 گرم ساخت شرکت ای آند دی⁸ ژاپن و شوف بالن ترمو⁹ مدل ای ام – 5000 سی ای¹⁰ ساخت کشور انگلستان استفاده شد. دستگاه های پلاریمتر پَرکین الِمِر¹¹ 343، اسپکتروفوتومتر واریان کری-100 بیو¹²، طیف سنج مادون قرمز نیکولت¹³ 5700، کروماتوگرافی گازی واریان 3400¹⁴، کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی مدل اچ پی II 5890¹⁵، (شرکت هولت-پکارد)¹⁶ ساخت کشور آمریکا بودند. از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو)¹⁷ به همراه ستون ژل-تی اس کاجی 3000 پی وی ایکس ال¹⁸

¹ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

² Dimethylsulfoxide

³ 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonic acid

⁴ Sigma

⁵ Merk

⁶ Fluka

⁷ Eppendorf

⁸ A & D

⁹ Thermo

¹⁰ EM-5000 CE

¹¹ Perkin - Elmer

¹² Varian Cary 100- Bio

¹³ Nicolet

¹⁴ Varian 3400

¹⁵ HP 5890 Series II GC

¹⁶ Hewlett-Packard

¹⁷ Shimadzu

¹⁸ TSK-GEL G3000 PWXL

ساخت توسو^۱ ژاپن به منظور کروماتوگرافی غربال مولکولی استفاده شد. طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای مدل بروکر آوی 500^۲، تبخیرکننده دورانی همراه با پمپ خلأ از شرکت هایدلف^۳، دستگاه آب مقطرگیری مدل جی اف ال 2004^۴، هات پلیت مدل آی کا - آرسی تی^۵، همگی ساخت کشور آلمان، در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. دیگر لوازم آزمایشگاهی و دستگاه های مورد نیاز در این تحقیق عبارت بودند از انواع ستون های کروماتوگرافی شیشه ای، کیسه دیالیز با 3/5 cut off کیلودالتون، قیف های بوختر، کاغذهای صافی، دماسنج، دسیکاتور و بن ماری (حمام آب گرم).

2-3- روش کار

1-2-3- استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه

های گیاه شکر تیغال سفالوتس

3-2-1- حذف ترکیبات رنگی

ریشه های خرد و پرک شده گیاه شکر تیغال سفالوتس با استفاده از اتانول 96٪ (یک قسمت ریشه 16 قسمت الکل) در دمای جوش به مدت 9 ساعت تحت فرآیند چربی زدایی و رنگ بری قرار گرفتند. در هر مرحله پس از جوشاندن به مدت 3 ساعت، اتانول استفاده شده تعویض و از حلال تازه اتانول برای افزایش بازدهی استفاده شد (علیزاده، 1396). هدف از انجام این کار حذف موادی مانند رنگ ها، مونوساکاریدها، ساپونین ها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کم وزن از ریشه گیاه است. پس از اتمام کار ریشه ها از اتانول جدا و در زیر هود خشک شدند.

¹ Tosoh
² Bruker AV-500
³ Heidolph
⁴ GFL 2004
⁵ IKA RCT

3-2-1-2- استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه

شکر تیغال سفالوتس

در این مرحله 30 گرم از ریشه های رنگ بری شده در تماس با آب مقطر (نسبت 1 به 20) در دمای 80°C به مدت سه ساعت قرار گرفتند. این مرحله سه بار تکرار شد و عصاره های حاصل از این مراحل با هم ادغام شدند. سپس ریشه ها از محلول جدا و عصاره حاصل از ریشه ها سانتریفیوژ شد. سپس به منظور کاهش حجم عصاره آبی، حجم آن در دستگاه تبخیر کننده تحت خلأ به میزان تقریبی یک ششم کاهش داده شد. عصاره آبی حاصل علاوه بر پلی ساکاریدهای تشکیل دهنده حاوی مواد دیگری از جمله پروتئین ها نیز می باشد. به منظور حذف پروتئین ها و خالص سازی عصاره آبی از روش سواگ استفاده شد (Staub, 1965). در این روش 20٪ حجم محلول آبی، کلروفرم و 20٪ حجم کلروفرم، بوتانول نرمال اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه هم زده شد. در ادامه پروتئین های دناتوره شده توسط دستگاه سانتریفیوژ به صورت لایه های رسوبی متشکل از کلروفرم، بوتانول و پروتئین و محلول آبی حاوی پلی ساکارید جداسازی شد. پس از این مرحله برای ترسیب پلی ساکاریدهای جدا شده از اتانول به میزان 3/5 برابر حجم محلول استفاده شد. مخلوط حاصل به مدت 24 ساعت در دمای یخچال قرار گرفت و سپس جداسازی سیال از رسوبات حاصل توسط دستگاه سانتریفیوژ صورت گرفت. رسوبات حاصل به عنوان پلی ساکاریدهای خام توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک و وزن پودر حاصل به وسیله ترازو اندازه گیری شد (جهان بین، 1390).

3-1-2-3- خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب از ریشه گیاه

شکر تیغال سفالوتس

برای خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب، از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز (۲/۶ سانتی متر × ۵۲ سانتی متر) و سفادکس جی - ۱۰۰ (۱/۶ سانتی متر × ۷۰ سانتی متر) استفاده شد. پس از آماده سازی ستون کروماتوگرافی، ۰/۱۵ گرم پلی ساکارید خام در آب مقطر (حدود ۸-۱۰ میلی لیتر) حل و به کمک پیپت به آرامی روی ستون حاوی فاز ساکن DEAE-سلولز تزریق شد. فاز متحرک در این تحقیق آب مقطر و محلول NaCl با گرادیان غلظت 0-1 نرمال و جریان حجمی 2/5 میلی لیتر بر دقیقه بود. نظارت بر عمل فراکشن گیری توسط روش فنول - اسید سولفوریک انجام گرفت (Dubois *et al.*, 1956) (شکل 3-3). سپس فراکشن های حاصل از ستون جمع آوری و به وسیله خشک کن انجمادی خشک شد. سپس به منظور انجام خلوص بیشتر از ستون کروماتوگرافی سفادکس جی - 100 استفاده شد. عمل شستشوی ستون با استفاده از آب مقطر با سرعت جریان حجمی 9 میلی لیتر بر ساعت انجام گرفت و در نهایت فراکشن پلی ساکاریدی غالب جمع آوری و به روش انجمادی خشک شد (شکل 3-4) (نبی کلجاهی، 1397).



شکل 3-3: فراكشن های جمع آوری شده و کنترل شده توسط روش فنول-اسید سولفوریک



شکل 3-4: پلی ساکارید خالص (سمت راست) و پلی ساکارید ناخالص (سمت چپ)

3-2-3- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکارید محلول در آب

پلی ساکارید خالص استخراج شده از ستون های کروماتوگرافی پس از خشک شدن به روش انجمادی برای شناسایی و تعیین ساختار توسط آزمون های زیر بررسی شد.

3-2-3-1- طیف فرابنفش پلی ساکارید خالص

به منظور بررسی خلوص مناسب پلی ساکارید و اطمینان از حذف مواد پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک از طیف فرابنفش استفاده شد و جذب در ناحیه 200-700 نانومتر بررسی گردید. جذب در ناحیه 280 و 260 نانومتر نشان دهنده وجود پروتئین و اسید نوکلئیک در نمونه می باشد. برای انجام این کار محلول پلی ساکاریدی به داخل سلولی از جنس کوارتز ریخته شد و در داخل دستگاه اسپکتروفتومتر واریان کری 100- بیو قرار گرفت و میزان جذب در ناحیه 280 و 260 نانومتر خوانده شد (Yu *et al.*, 2017; Jahanbin *et al.*, 2017).

3-2-3-2- تعیین همگنی¹ و وزن مولکولی پلی ساکارید

تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب توسط دستگاه کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا مجهز به آشکارساز ضریب شکست نور مدل آرآی دی - 10² (شیمادزو-ژاپن) محاسبه شد. ستون مورد استفاده از جنس ژل - تی اس کاجی 3000 پی وی ایکس ال ساخت توسو ژاپن و به ابعاد 7/8 × 300 میلی لیتر بود. دما در طی آزمایش در 40°C ثابت نگه داشته شد و برای تهیه منحنی کالیبراسیون

¹ Hemogeneity
² RID-10A

از استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی 5000، 10/000، 40/000، 70/000، 200/000 دالتون استفاده گردید. در نهایت وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه شد (Sahragard *et al.*, 2017; Shabani *et al.*, 2016).

3-3-2-3- اندازه گیری درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید محلول در آب گیاه شکر تیغال سفالوتس با استفاده از دستگاه پلاریمتر پرکین المر ۳۴۳ ساخت کشور آمریکا اندازه گیری شد. به این منظور، ۱۰۰ میلی گرم پلی ساکارید خالص با ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در حمام آب جوش به مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد و سپس رقت سازی صورت گرفت. برای انجام عمل رقت سازی ۵ میلی گرم از پلی ساکارید هیدرولیز شده به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شد و به لوله ۲ دسی متری دستگاه تزریق گردید. در پایان درجه چرخش نوری در طول موج ۵۸۹ nm و دما ۲۰°C با استفاده از رابطه زیر تعیین شد (جهان بین، ۱۳۹۰).

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

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

3-3-2-4- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید

تعیین قند کل به روش رنگ سنجی فنول-اسید سولفوریک در طول موج 490 نانومتر و با استفاده از استاندارد دی - گلوکز صورت گرفت. در این آزمون به 1 سی سی محلول پلی ساکاریدی، 1 سی سی فنول

5٪ و 5 سی سی اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و پس از 10 دقیقه استراحت به مدت 30 دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت و میزان جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Dubois *et al.*, 1956).

تعیین کمی و کیفی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل واریان 3400 (ساخت کشور آمریکا) و آشکارساز یونش شعله ای انجام شد. ستون دستگاه از نوع مویینه دی ام-2330 (30 متر × 0/32 متر × 0/2 میکرومتر) بود. روش آماده سازی نمونه جهت تزریق به دستگاه GC به شرح زیر است:

ابتدا 15 میلی گرم پلی ساکارید خالص به همراه 2 میلی لیتر محلول 2 مولار اسید تری فلورواستیک در لوله آزمایش ریخته شد و پس از بستن درب لوله به مدت 2 ساعت در معرض دمای 120 °C قرار گرفت. پس از انجام هیدرولیز، اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب 40°C حذف شد و نمونه هیدرولیز شده توسط 50 میلی گرم بروهیدرید سدیم خنثی گردید. در ادامه، نمونه ها توسط اسید استیک، اسیدی شدند و اسید بوریک اضافی با کمک متانول حذف شد. آلدیتول های حاصل توسط مخلوط پیریدین-انیدرید استیک (1 به 1) به مدت 1 ساعت در حمام آب 90°C استیله شدند و به استات های آلدیتول مربوطه تبدیل گردیدند. برای تهیه استاندارد آزمایش، استات های آلدیتول مونوساکاریدهای استاندارد (دی-گلوکز، دی-گالاکتوز، دی-مانوز، دی-زایلوز، اسید دی-گلوکورونیک، ال-رامنوز، ال-آرابینوز و اسید ال-گالاکتورونیک) مانند روش ذکر شده در بالا تهیه شدند و به همراه 2 میلی گرم میو - اینوزیتول (به عنوان استاندارد داخلی) به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شدند. برنامه دمایی و زمانی تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی بدین شرح بود: دمای ستون در 120°C به مدت 2 دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای 250°C با نرخ 8°C بر دقیقه افزایش یافت و به مدت 3 دقیقه در همین دما نگه داری شد. ازت به عنوان

گاز حامل با سرعت جریان حجمی $1/2$ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ و $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ بود (صحراگرد، 1395).

3-2-3-5- بررسی طیف مادون قرمز پلی ساکارید

طیف مادون قرمز پلی ساکارید محلول در آب به منظور تعیین نوع گروه های عاملی توسط دستگاه طیف سنج مادون قرمز مدل نیکولت 5700 حاصل شد. برای این منظور، 1-2 میلی گرم پلی ساکارید کاملاً خالص با پودر برمیدپتاسیم (درجه خلوص اسپکتروسکوپی) مخلوط و به اندازه یک قرص 1 میلی متری فشرده شد و در دستگاه طیف سنج مادون قرمز قرار گرفت. درصد نور عبور داده شده در محدوده فرکانس 4000 cm^{-1} تا 400 محاسبه و نمودار حاصل از آن رسم شد (صحراگرد، 1395).

3-2-3-6- هیدرولیز ناقص اسیدی

هیدرولیز ناقص اسیدی برای مشخص کردن ماهیت شاخه ها و نیز زنجیر اصلی پلی ساکارید انجام شد. برای هیدرولیز ناقص اسیدی 80 میلی گرم پلی ساکارید توسط 3 میلی لیتر محلول 0/05 مولار اسید تری فلورواستیک در دمای $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ به مدت 16 ساعت هیدرولیز شد. پلی ساکارید هیدرولیز شده به منظور حذف رسوبات سانتریفیوژ شد و رسوبات جدا شده تحت عنوان پلی ساکارید 1 نامگذاری گردید. سپس سیال رویی به مدت 24 ساعت دیالیز شد و در انتها فراکشن جدا شده جمع آوری و تحت عنوان پلی ساکارید 4 نامگذاری گردید. سیال باقیمانده در کیسه دیالیز توسط اتانول رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عنوان پلی ساکارید 2 و 3 نامگذاری شدند. تمامی فراکشن ها پس از خشک شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، همانطور که قبلاً شرح داده شد، آنالیز شدند (علیزاده، 1396).

3-2-3-7- اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت

اکسیداسیون پرپودات به طور گسترده در شیمی کربوهیدرات ها برای به دست آوردن الگوها، نوع شاخه و تناوب به کار می رود. تجزیه اسمیت برای تکمیل کردن اکسیداسیون پرپودات مفید است. این واکنش می تواند پلی ساکاریدها را به صورت انتخابی اکسید کند و به واحدهای تکراری و کوچکت الیگوساکارید تبدیل نماید و به این ترتیب اطلاعاتی از ساختار حاصل می شود (Zhang et al., 2014). برای انجام آزمایش 25 میلی گرم پلی ساکارید خالص در 12/5 میلی لیتر آب مقطر حل و با 12/5 میلی لیتر پرپودات 30 میلی مولار مخلوط شد. مخلوط حاصل در 4 C ° به مدت 72 ساعت در تاریکی نگه داری شد و جذب آن هر 4 ساعت در 223 نانومتر ثبت گردید. با افزودن گلیکول و حذف پرپودات سدیم اضافی به واکنش اکسیداسیون خاتمه داده شد. مصرف پرپودات و تولید اسید فرمیک به روش اسپکتروفتومتری و تیتراسیون با محلول 0/053 مولار سود تعیین شد. محصولات حاصل از پرپودات به مدت 48 ساعت دیالیز شدند و سپس با بروهیدرید سدیم خنثی سازی انجام شد. در ادامه فرآیند هیدرولیز توسط اسید تری فلورواستیک در 100 °C به مدت 2 ساعت انجام گرفت و در نهایت محصول استیل شده توسط کروماتوگرافی گازی به روشی که قبلا شرح داده شد آنالیز گردید (Luo et al., 2017).

3-2-3-8- متیله کردن پلی ساکارید خالص

در این مرحله 10 میلی گرم پلی ساکارید خالص به طور دقیق توزین شد و در 10 میلی لیتر DMSO حل گردید. محلول به دست آمده توسط دستگاه امواج فراصوت به مدت 30 دقیقه تیمار شد و پس از یک ساعت گرمخانه گذاری در دمای 25°C، 3 میلی لیتر یدید متیل به آن افزوده شد. واکنش در دمای اتاق و محیطی تاریک به مدت 8 ساعت صورت گرفت. سپس به منظور پایان دادن به واکنش 3 میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. محصولات واکنش توسط 6 میلی گرم کلروفرم استخراج شدند و به وسیله تبخیر کننده دورانی در فشار پایین خشک گردیدند. تکمیل عمل متیله شدن با عدم مشاهده جذب در طول موج 3700 cm^{-1}

تا ۳۲۰۰ که نشان دهنده عدم وجود گروه های هیدروکسیل بود تایید شد. پلی ساکاریدهای متیله شده توسط اسید تری فلورواستیک ۲ مولار هیدرولیز شدند و در ۲ میلی لیتر سود ۰/۲٪ به منظور حذف اسیدهای اضافی حل گردیدند. واکنش در دمای ۴°C به مدت ۳۰ دقیقه کنترل شد. سپس محصولات حاصل با افزودن ۲ میلی لیتر انیدرید استیک و ۲ میلی لیتر پیریدین و قرار گرفتن در دمای ۱۰۰°C به مدت سه ساعت استیله شدند. استات های آلدیتول حاصل توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی به شرح زیر مورد آزمون قرار گرفت:

دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی دارای ستون مویینه کوارتزی اچ پی اس^۱ در ابعاد ۲۵ متر × ۰/۲۲ میلی متر × ۰/۲ میکرومتر بود. دمای اولیه ستون به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰°C ثابت ماند و سپس تا دمای (۲۶۰°C با نرخ ۱۵°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در همین دما ثابت ماند. سایر مشخصات با کروماتوگرافی گازی قسمت شناسایی مونوساکاریدها مشابه بود (Tu et al., 2016).

3-2-3-9- طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR)

روش طیف سنجی NMR قوی ترین روش برای تعیین ساختار پلی ساکاریدها است. این روش می تواند اطلاعاتی از جمله موقعیت آنومرهای آلفا و بتا، ترتیب توالی و محل گروه واحدهای قندی، پیوندهای گلیکوزیدی در الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها را ارائه دهد (Cui, 2005).

در این مرحله پلی ساکارید خالص در D₂O (99/9٪) به عنوان حلال بی اثر حل شد و بین دو قطب مغناطیسی دستگاه NMR قرار گرفت. مدت زمان بازداری ۲ ثانیه و استاندارد مورد استفاده DSS بود. تغییرات ایجاد شده روی هسته های پروتون و کربن -۱۳ به ترتیب در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز و ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز

^۱ HPS

در دمای °C ۲۷ توسط دستگاه ثبت شد و جا بجایی پیک ها بر حسب ppm نمایش داده شد. نمودار حاصل از دستگاه NMR با پیک ها و خطوط حاصل از جسم استاندارد مورد مقایسه و ارزشیابی قرار گرفت.

3-2-3-10- بررسی خاصیت ضد اکسندگی

فعالیت ضد اکسندگی از طریق آزمون DPPH و به وسیله معرف 2 و 2 دی فنیل-1 پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام شد (Jahanbin *et al.*, 2011). برای این منظور پلی ساکارید خالص در آب مقطر حل شد و غلظت های 0/05، 0/1، 0/2، 0/4، 1، 2، 4 و 8 میلی گرم بر میلی لیتر از آن تهیه شد. آب مقطر با غلظت صفر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. در ادامه 2 میلی لیتر از محلول متانولی DPPH، تهیه شده به صورت تازه در غلظت 0/1 میلی مولار به 1 میلی لیتر، از نمونه های مورد آزمایش اضافه شد و پس از تکان شدید، مخلوط در دمای °C 25 به مدت 30 دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس جذب آن در 517 نانومتر ثبت گردید. از اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت استفاده شده و تمام آزمایشات در سه نوبت تکرار و میانگین آن ها لحاظ گردید. قابلیت مهارکنندگی رادیکال های DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$100 \times (\text{جذب شاهد/جذب نمونه}) - 1 = \text{فعالیت مهارکنندگی DPPH}$$

فصل چہارم

نتایج و بحث

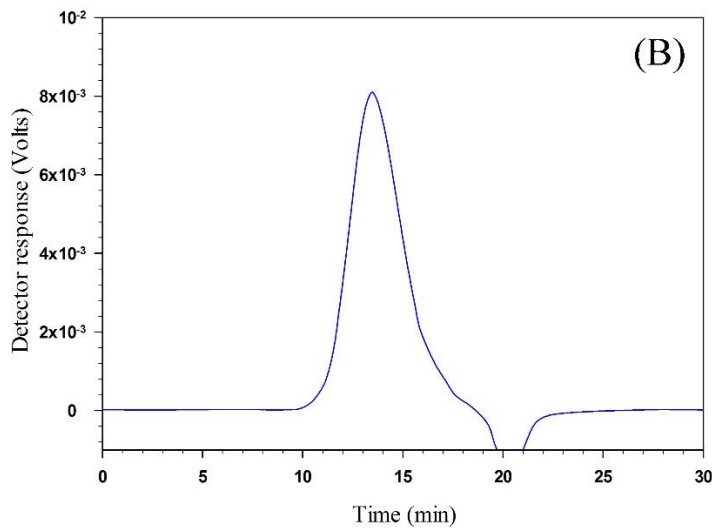
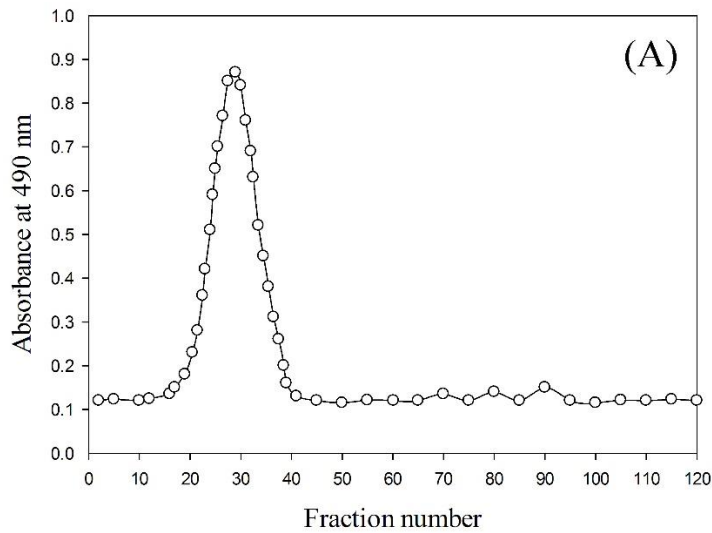
1-4- جداسازی پلی ساکارید ریشه گیاه شکر تیغال سفالوتس

ریشه های گیاه شکر تیغال سفالوتس پس از حذف ترکیبات رنگی، مواد چربی و مونوساکاریدها توسط اتانول، خشک گردید و در ادامه در آب داغ با دمای 80°C غوطه ور شد تا پلی ساکاریدهای محلول در آب آن استخراج شود. پس از حذف آب مازاد، پروتئین ها از محلول آبی حذف شدند و در نهایت پلی ساکاریدهای موجود در آب با استفاده از اتانول رسوب و جدا شد. پلی ساکارید حاصل با عنوان پلی ساکارید ناخالص نامگذاری شد و راندمان تولید آن از ریشه های گیاه 1/53٪ بود که این راندمان کمتر از گونه نیش دار (5/45٪) بود. در ادامه پلی ساکارید ناخالص برای انجام مراحل خالص سازی نهایی به ترتیب از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس جی-100 عبور داده شد. شستشوی ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز به ترتیب توسط آب و گرادیان نمک طعام با غلظت های 0/1 تا 1 مولار صورت گرفت و فراکشن های حاصل جمع آوری گردید. کنترل فرایند در طی مراحل فراکشن گیری توسط روش فنول-اسید سولفوریک صورت گرفت (شکل 3-3، فصل سوم). فراکشن خنثی نسبت به نوع اسیدی از مقدار بیشتری برخوردار بود به همین علت برای مراحل بعدی کار از آن استفاده گردید و تحت عنوان پلی ساکارید خالص نامگذاری شد (شکل 4-1) که راندمان آن از پلی ساکارید ناخالص داده شده به ستون 10٪ بود.



شکل 4-1: پلی ساکارید خالص (راست) و ناخالص (چپ)

در نهایت خالص سازی نهایی پلی ساکارید خالص توسط ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-100 و بر اساس وزن مولکولی صورت گرفت. شستشوی ستون توسط آب مقطر انجام شد و در نهایت فراکشن های شماره 18 تا 40 (شکل 2-4 بخش A) ادغام و به نام پلی ساکارید کاملاً خالص نامگذاری شد.



شکل 2-4: کروماتوگرام فراکشن های شسته شده با ستون سفادکس جی-100 (A) و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا (HPGPC) (B)

راندمان پلی ساکارید کاملاً خالص شسته شده از ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-100، حدود 91٪ نسبت به پلی ساکارید خالص وارد شده به ستون محاسبه شد. هیچ جذبی در نواحی 260 و 280 نانومتر از طیف فرابنفش مشاهده نشد که بیانگر این حقیقت بود که پلی ساکارید کاملاً خالص فاقد پروتئین و اسیدهای نوکلئیک بود و مراحل خالص سازی با موفقیت انجام گرفته بود.

4-2- شناسایی همگنی و تعیین وزن مولکولی

جهت شناسایی همگنی و تعیین وزن مولکولی پلی ساکارید کاملاً خالص از دستگاه کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا (HPGPC) با کمک استانداردهای دکستران استفاده شد. شکل 4-2 بخش B نشان می دهد که پلی ساکارید کاملاً خالص پیکی متقارن و منحصر به فردی دارد که دلیل بر همگن بودن پلی ساکارید کاملاً خالص است. میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس با مقایسه منحنی استاندارد دکستران برابر با 82400 دالتون (82/4 کیلودالتون) محاسبه شد. تحقیقات صورت گرفته در رابطه با شناسایی ساختار و تعیین وزن مولکولی در جنس شکر تیغال محدود به گونه های لاتیفولیوس تاچ و نیش دار می باشد. بین و همکاران پلی ساکارید محلول در آب گونه لاتیفولیوس تاچ را با روش آب گرم استخراج کرده و با انجام آنالیزهای مربوطه مشخص شد که این پلی ساکارید یک پلی ساکارید محلول در آب همگن با وزن مولکولی حدود 118000 دالتون است (Bin *et al.*, 2014). حسینیان پلی ساکارید محلول در آب گونه نیش دار را با آب 70°C استخراج کرد و مشخص شد که وزن مولکولی پلی ساکارید گونه نیش دار حدود 65700 دالتون است (حسینیان، 1397). همچنین در تحقیقی دیگر که روی مان شکر تیغال انجام شد وزن مولکولی هفت پلی ساکارید استخراج شده بین 667/67-1 کیلودالتون بود (Hamedi *et al.*, 2015). مقایسه تحقیقات انجام شده توسط بین و همکاران و حسینیان و تحقیق پیش رو نشان می دهد که وزن مولکولی پلی ساکارید غالب محلول در آب ریشه های گونه سفالوتس

از گونه لاتیفولیوس کمتر و از گونه نیش دار بیشتر است و دلیل این تفاوت احتمالاً در ساختار پلی ساکارید و نیز نوع گونه، آب و هوا و منطقه ای است که گیاه در آن رشد کرده است.

3-4- محاسبه درجه چرخش نوری

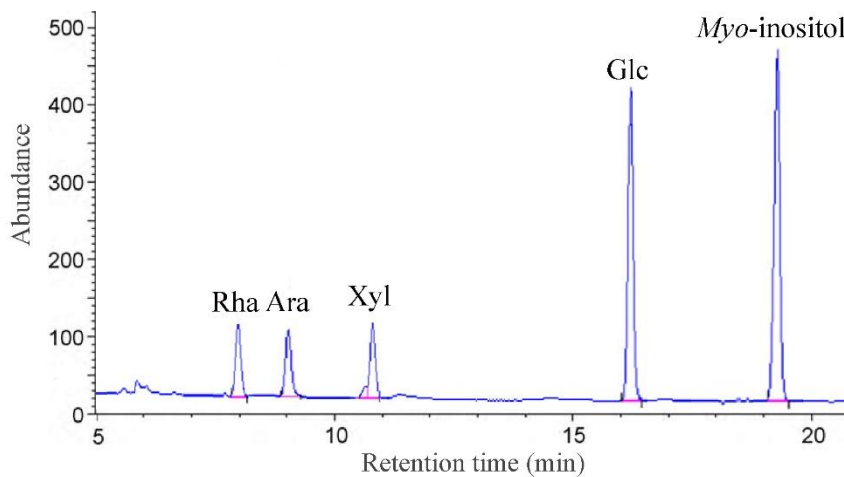
درجه چرخش نوری پلی ساکاریدها بیانگر نوع اتصالات موجود بین مونومرها در زنجیر پلی ساکارید است. مقدار درجه چرخش نوری پلی ساکارید کاملاً خالص توسط دستگاه پلاریمتر در دمای 20°C ، $5/19^{\circ}$ + محاسبه شد. درجه چرخش نوری بالای 100° + نشان دهنده سهم بیشتر اتصالات نوع آلفا (α) و درجه چرخش نوری زیر 10° + بیانگر سهم بالاتر اتصالات نوع بتا (β) در ساختار قندهاست. با بررسی درجه چرخش $5/19^{\circ}$ + پلی ساکارید کاملاً خالص می توان استنباط کرد که هر دو نوع اتصالات آلفا و بتا می تواند در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص وجود داشته باشد که با توجه به نزدیک تر بودن درجه چرخش نوری پلی ساکارید کاملاً خالص به 10° + می توان نتیجه گرفت که احتمالاً سهم اتصالات نوع بتا نسبت به آلفا در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص بیشتر است.

4-4- مقدار قند کل و شناسایی واحدهای سازنده پلی ساکارید کاملاً خالص

یکی از راه های پی بردن به درجه خلوص پلی ساکاریدها تعیین مقدار قند کل در ساختار آن هاست و هرچقدر این مقدار بالاتر باشد نشان دهنده خالص تر بودن پلی ساکارید است. مقدار قند کل پلی ساکارید کاملاً خالص با استفاده از روش فنول-اسید سولفوریک اندازه گیری شد و مقدار $96/9\%$ تعیین گردید. راندمان بالای حاصل نشان می دهد که مراحل خالص سازی با موفقیت انجام گرفته است.

جهت پی بردن به نوع واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده، ابتدا پلی ساکارید کاملاً خالص به وسیله اسیدتری فلورواستیک به واحدهای مونومری تشکیل دهنده خود هیدرولیز شد و سپس از استیل شده و

تبدیل شدن به استات های آلدیتول مربوطه، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز گردید. کروماتوگرام گازی حاصل (شکل 3-4) نشان داد که پلی ساکارید کاملاً خالص از مونوساکاریدهای گلوکز، آرابینوز، زایلوز و رامنوز به ترتیب با نسبت های مولی 1/00، 1/06، 0/98، 4/12 (حدود 1:1:1:4) تشکیل شده است.



شکل 3-4: کروماتوگرام گازی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید شکر تیغال سفالوتس

اندازه گیری اسیدهای ارونیک با روش اسپکتروفتومتری نشان داد که پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس فاقد اسیدهای ارونیک است و از این رو می توان نتیجه گرفت که پلی ساکارید کاملاً خالص مورد بررسی خنثی و از نوع گلوکان است.

در تحقیقی که روی گونه لاتیفولیوس تاچ توسط بین و همکاران انجام شد مشخص گردید که پلی ساکارید استخراج شده پلیمری از واحدهای اسید گالاکتورونیک است (Bin et al., 2014). حامدی و همکاران گزارش کردند که از بین 7 پلی ساکارید استخراج شده، پلی ساکارید شماره 1 حاوی آرابینوز (9%/78)، گالاکتوز (2%/94)، گلوکز (3%/19)، اسید گالاکتورونیک (30%/12) و مانوز (6%/07)، پلی ساکارید شماره 2 حاوی 6-داکسی مانوز (35%/74)، گالاکتوز (12%/24)، گلوکز (4%/53) و اسید گالاکتورونیک (43%/08)، پلی ساکارید شماره 3 حاوی اسید گالاکتورونیک (97%/37)، پلی ساکارید شماره 4 حاوی گلوکز (24%/17) و

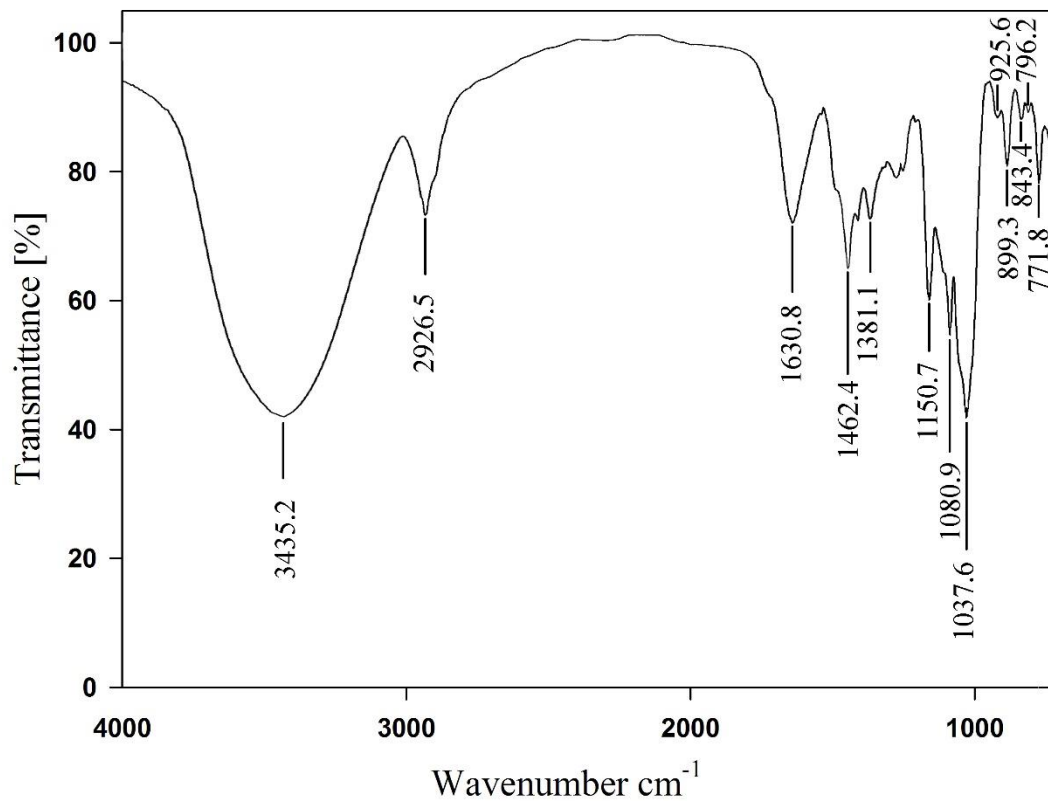
اسید گالاکتورونیک (45%/38)، پلی ساکارید شماره 5 حاوی گلوکز (20%/14) و اسید گالاکتورونیک (64%/93)، پلی ساکارید شماره 6 حاوی 6-داکسی مانوز (21%/59)، آلتروز (1%/37)، آرابینوز (5%/85)، گالاکتوز (5%/32)، گلوکز (1%/32)، گلوکز-2 آمینو-2-داکسی (6%/86)، اسید گالاکتورونیک (26%/44)، مانوز (0%/64)، مانیتول (0%/26)، زایلیتول (0%/32) و زایلوپیرانوز (0%/98) و پلی ساکارید شماره 7 حاوی گلوکز (19%/44)، اسید گالاکتورونیک (49%/44) و مانوز (2%/38) است (Hamedi et al., 2015).

همچنین در تحقیقی که روی گونه نیش دار توسط حسینیان انجام شد مشخص گردید که پلی ساکارید کاملاً خالص متشکل از واحدهای گالاکتوز (Gal)، گلوکز (Glc)، مانوز (Man)، زیلوز (Xyl) و آرابینوز (Ara) به ترتیب با نسبت های مولی 0/96، 5/23، 1/00، 2/06 و 1/04 (1:2:1:5:1) است و در گروه زیلوگلوکان ها قرار دارد (حسینیان، 1397).

4-5- طیف مادون قرمز پلی ساکارید کاملاً خالص

از طیف مادون قرمز جهت شناسایی گروه های عاملی، پی بردن به نوع حلقه ها و اشکال آنومری واحدهای مونومری سازنده پلی ساکاریدها استفاده می شود. طیف مادون قرمز پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس در شکل 4-4 آمده است. وجود جذب در $3435/2 \text{ cm}^{-1}$ در طیف مادون قرمز بیانگر وجود گروه های هیدروکسیل است. جذب در $2926/5 \text{ cm}^{-1}$ ارتعاشات C-H کربن شماره 6 قندها را نشان می دهد و جذب در $1630/8 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده اتصال با مولکول های آب است. وجود جذب در $1462/4 \text{ cm}^{-1}$ و $1381/1$ نشان دهنده ارتعاشات C-H در ساختار حلقه های موجود در پلی ساکارید است. جذب در $1150/7 \text{ cm}^{-1}$ اتصالات اتری C-O (C-O-C) و جذب در $1080/9$ و $1037/6$ اتصالات الکلی C-O (C-O-H) را نشان می دهد. وجود جذب در $899/3 \text{ cm}^{-1}$ بیانگر وجود اتصالات گلیکوزیدی با کنفورماسیون آنومری نوع بتا (β) و جذب در $843/4 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده وجود کنفورماسیون آنومری نوع

آلفا (α) در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص است. جذب در $796/2$ و $925/6$ cm^{-1} بیانگر حضور حلقه های فورانوزی و جذب در $771/8$ cm^{-1} نشان دهنده حضور حلقه های پیرانوزی در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص است.



شکل 4-4: طیف مادون قرمز پلی ساکارید کاملاً خالص

با جمع بندی نتایج حاصل از طیف مادون قرمز می توان بیان کرد که پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس از واحدهای مونوساکاریدی با هر دو شکل حلقه های پیرانوزی و فورانوزی به همراه هر دو نوع اتصال آنومری بتا و آلفا تشکیل شده است.

4-6- هیدرولیز ناقص اسیدی

چهار فراکشن شامل پلی ساکارید 1 (رسوب کرده پس از هیدرولیز)، پلی ساکارید 2 (رسوب موجود در کیسه دیالیز)، پلی ساکارید 3 (سیال رویی موجود در کیسه دیالیز) و پلی ساکارید 4 (فراکشن خارج از کیسه دیالیز)، پس از انجام هیدرولیز ناقص اسیدی از پلی ساکارید کاملاً خالص بازیافت و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، پس از انجام هیدرولیز کامل توسط اسیدتری فلورواستیک، آنالیز شدند (جدول 4-1).

جدول 4-1: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی

نسبت های مولی				فراکشن ها
زایلوز	آرابینوز	رامنوز	گلوکز	
—	—	—	1/00	پلی ساکارید 1
—	—	—	1/00	پلی ساکارید 2
1/04	1/00	1/09	—	پلی ساکارید 3
1/08	1/00	1/12	—	پلی ساکارید 4

با مراجعه به جدول 4-1 می توان استنباط کرد که مونوساکارید گلوکز واحدهای مونومری اسکلت اصلی پلی ساکارید کاملاً خالص را تشکیل می دهد زیرا فقط گلوکز در پلی ساکارید های 1 و 2 شناسایی شده است. پلی ساکارید های 3 و 4 از واحدهای مونوساکاریدی رامنوز، زایلوز و آرابینوز تشکیل شده که نسبت های مولی آن ها تقریباً با هم برابر است لذا می توان عنوان کرد که شاخه های متصل شده به اسکلت اصلی پلی

ساکارید کاملاً خالص از واحدهای رامنوز، زایلوز و آرابینوز تشکیل شده و مونومرهای ذکر شده به مقدار مساوی در محل شاخه ها قرار دارند.

7-4- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت

نتایج اکسیداسیون پریودات پلی ساکارید کاملاً خالص نشان داد که $1/31$ مول پریودات مصرف شد و حدود $0/58$ مول اسید فرمیک تولید گردید. مقدار تولید اسید فرمیک بیانگر این واقعیت است که در حدود 58% از اتصالات موجود در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص از نوع $(1 \rightarrow)$ یا $(1 \rightarrow 6)$ است. مقدار پریودات مصرف شده بیش از 2 برابر تولید اسید فرمیک بود که نشان می دهد اتصالاتی مانند $(1 \rightarrow 2)$ ، $(1 \rightarrow 4)$ و مشتقات آن ها در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارند که قادر به تولید اسید فرمیک نیستند و سهم آن ها حدود 15% است. با توجه به مقدار $1/31$ مول پریودات مصرفی می توان نتیجه گرفت که اتصالاتی مانند $1 \rightarrow 3$ و مشتقات آن نیز در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص وجود دارند و سهم آن ها حدود 27% است. آنالیز کروماتوگرافی گازی محصولات کاملاً هیدرولیز شده حاصل از اکسیداسیون پریودات (جدول 4-2) نشان دهنده عدم حضور رامنوز و زایلوز و حضور گلوکز و آرابینوز بود. عدم حضور رامنوز و زایلوز بیان کننده این واقعیت است که تمام واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده حاوی اتصالاتی هستند که توسط پریودات اکسید می شوند مانند $(1 \rightarrow)$ ، $(1 \rightarrow 6)$ ، $(1 \rightarrow 2)$ ، $(1 \rightarrow 6)$ و $(1 \rightarrow 4)$ و $(1 \rightarrow 6)$ و $(1 \rightarrow 4)$.

جدول 4-2: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت

نسبت های مولی						فراکشن ها
زایلوز	آرابینوز	رامنوز	گلوکز	اریتریتول	گلیسرول	
محصولات اکسیداسیون پرپودات						
—	1/03	—	1/00	1/13	1/98	هیدرولیز کامل اسیدی
تجزیه اسمیت						
—	0/94	—	1/00	1/01	2/07	بیرون کیسه دیالیز
—	—	—	1/00	—	—	رسوب در کیسه دیالیز

وجود گلوکز و آرابینوز در محصولات اکسیداسیون پرپودات نشان می دهد که بخشی از واحدهای مونومری نامبرده اتصالاتی دارند که توسط پرپودات اکسید نمی شوند مانند (1→3)، (3→2→1)، (4→3→1) و (6→3→1). وجود گلیسرول و اریتریتول در محصولات حاصل از اکسیداسیون پرپودات بیانگر حضور اتصالات (1→)، (1→6)، (1→4) و (6→4→1) در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص است. وجود گلوکز در رسوب موجود در کیسه دیالیز نشان می دهد که اسکلت اصلی پلی ساکارید کاملاً خالص به طور کامل توسط پرپودات اکسید نشده و از این رو اتصالات (1→3) و مشتقات آن که توسط پرپودات اکسید نمی شوند در اسکلت اصلی پلی ساکارید کاملاً خالص حضور دارند.

4-8- متیله کردن پلی ساکارید کاملاً خالص

آزمون متیله کردن قدرتمندترین آزمون جهت پی بردن به ساختار پلی ساکاریدهاست. با استفاده از این آزمون دسترسی به اطلاعات بسیار مهمی از پیکره ساختمانی پلی ساکارید مانند نوع واحدهای مونومری، نوع اتصالات، محل انشعابات، تعداد شاخه ها و نوع حلقه های واحدهای مونومری (پیرانوز و فورانوز) امکان

پذیر است. جدول 3-4، نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید کاملاً خالص را نشان می دهد.

جدول 3-4: نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید کاملاً خالص متیله شده

نسبت مولی	فراگمنت های جرمی (m/z)	نوع اتصال	قند متیله شده
2/13	43, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233	→6)-Glc _p -(1→	2,3,4-Me ₃ -Glc
1/01	43, 87, 117, 129, 189	→3,6)-Glc _p -(1→	2,4-Me ₂ -Glc
0/95	43, 85, 102, 118, 127, 162, 201, 261	→4,6)-Glc _p -(1→	2,3-Me ₂ -Glc
1/14	43, 87, 101, 129, 143, 189, 203	Rhap-(1→	2,3,4-Me ₃ -Rha
0/98	43, 59, 71, 101, 117, 129, 160, 174, 201, 233	→3)-Araf-(1→	2,5-Me ₂ -Ara
1/07	43, 88, 102, 117, 161	Xyl _p -(1→	2,3,4-Me ₃ -Xyl

مطابق جدول 3-4، نتایج حاصل حضور 6 پیک متفاوت را نشان داد. این پیک ها پس از شناسایی عبارت بودند از 2و3و4-تری متیل گلوکز، 2و4-دی متیل گلوکز، 2و3-دی متیل گلوکز، 2و3و4-تری متیل رامنوز، 2و5-دی متیل آرابینوز و 2و3و4-تری متیل زایلوز که به ترتیب با نسبت های مولی 2/13، 1/01، 0/95، 1/14، 0/98 و 1/07 (حدود 1:1:1:1:2)، در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص وجود داشتند. نسبت های مولی حاصل از آزمون متیله کردن با نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید کاملاً خالص تطابق داشت. به علاوه نتایج حاصل همخوانی بالایی را با نتایج حاصل از آزمون اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت نشان داد. نسبت مولی گلوکز با اتصال 6→1 بیشتر از نسبت مولی سایر قندهای متیله شده بود لذا می توان استنباط کرد که اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص ریشه های شکر تیغال سفالتوس از واحدهای گلوکز با اتصال 6→1 تشکیل شده است. نسبت های مولی گلوکز با اتصالات 6و3→1 و 6و4→1 که محل شاخه ها را نشان می دهد با مجموع نسبت های مولی

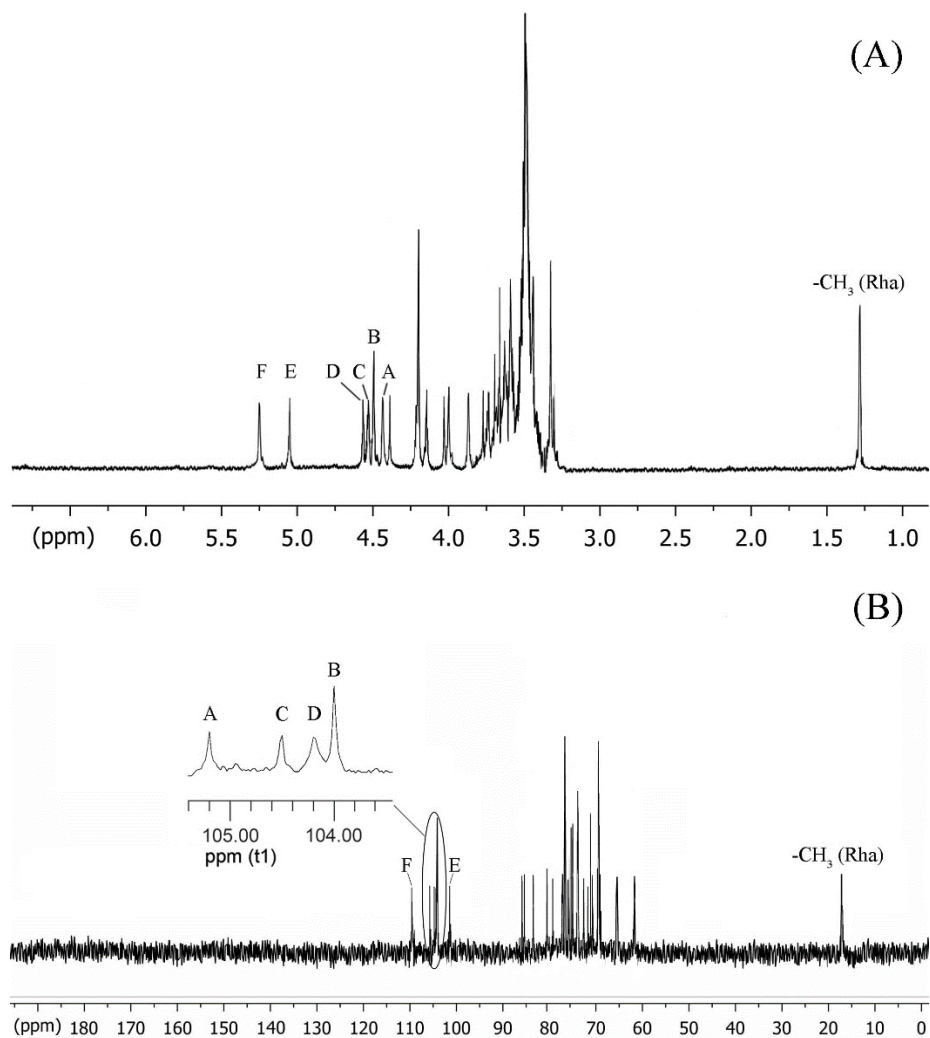
زایلوز و رامنوز با اتصال $\rightarrow 1$ (مربوط به پایانه غیراحیاء کننده شاخه ها)، تقریباً برابر بود لذا می توان عنوان کرد که متیلاسیون به طور کامل انجام شده و تمام شاخه های موجود در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص توسط واحدهای زایلوز و رامنوز به انتها می رسد. درجه شاخه دار بودن پلی ساکارید کاملاً خالص نیز حدود 27٪ محاسبه شد. عدم مشاهده گروه های متیل روی کربن های شماره 5 واحدهای مونومر گلوکز، رامنوز و زایلوز نشان می دهد که تمام واحدهای مونومری نامبرده ساختار حلقه ای شش ضلعی (پیرانوزی) دارند حال آن که مشاهده گروه متیل روی کربن شماره 5 آرابینوز نشان دهنده وجود حلقه های پنج ضلعی (فورانوزی) در ساختار واحدهای آرابینوز است. این نتیجه با نتیجه حاصل از آزمون طیف مادون قرمز پلی ساکارید کاملاً خالص (جذب در نواحی $796/2$ ، $925/6$ و $771/8$ cm^{-1}) کاملاً همخوانی داشت.

9-4- NMR پلی ساکارید کاملاً خالص

شکل 4-5، NMR پروتون و کربن 13 پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس را نشان می دهد. بخش آنومری در شکل 4-5 (A) که مربوط به سیگنال های محدوده ppm 4/3 به بعد می باشد 6 سیگنال آنومری متفاوت را نشان می دهد که ترتیب نامگذاری آن ها روی شکل از A تا F بر اساس افزایش مقادیر جابجایی شیمیایی آن هاست.

بر اساس اطلاعات اولیه در مورد متیلاسیون پلی ساکارید کاملاً خالص و نیز منابع موجود در ارتباط با مقادیر شیمیایی پلی ساکاریدها، وجود سیگنال در 4/43، 4/51، 4/52، 4/54، 5/05 و 5/25 ppm به ترتیب مربوط به واحدهای مونومری بتا-د-زایلوپیرانوز (با اتصال $\rightarrow 1$)، بتا-د-گلوکوپیرانوز (با اتصالات $\rightarrow 6$ ، $\rightarrow 1$ ، $\rightarrow 4$ و $\rightarrow 6$)، آلفا-ال-رامنوپیرانوز (با اتصال $\rightarrow 1$) و آلفا-ال-آرابینوفورانوز (با اتصال $\rightarrow 4$) است.

وجود 6 سیگنال در محدوده آنومری NMR پروتون پلی ساکارید کاملاً خالص که بیانگر وجود 6 ترکیب مختلف در ساختار پلی ساکارید کاملاً است با نتایج حاصل از متیله کردن که قبلاً عنوان شد کاملاً مطابقت داشت.



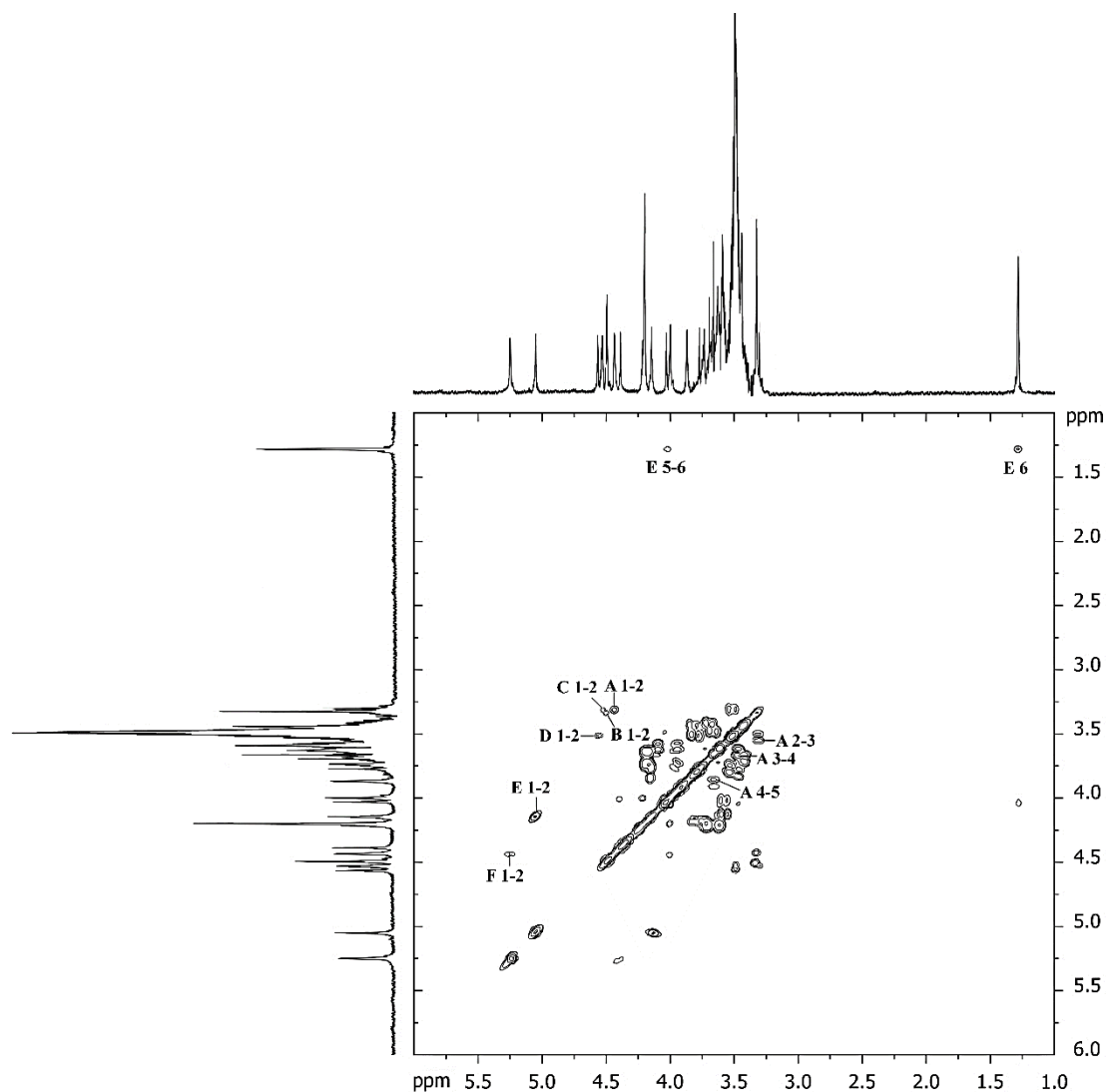
شکل 4-5: طیف NMR پروتون (A) و کربن-13 (B) پلی ساکارید خالص

با توجه اینکه سیگنال های نواحی 3 تا 4/3 ppm طیف NMR پلی ساکارید همپوشانی بالایی دارند و تمایز سیگنال ها به آسانی ممکن نیست، طیف کربن-13 پلی ساکارید کاملاً خالص اندازه گیری شد (شکل 4-5)

(B). وجود 6 سیگنال آنومری که قبلاً با حرف A تا F مشخص شدند مجدداً در طیف NMR کربن-13 پلی ساکارید کاملاً خالص دیده شد. با بررسی سیگنال های مربوط به کربن-13 پلی ساکارید کاملاً خالص و مقایسه آن ها با منابع مشخص شد که سیگنال در نواحی 104/1، 104/3، و 104/2 ppm به ترتیب مربوط به بتا-دی-گلوکوپیرانوز با اتصالات 1→6، 1→4 و 6 و 3→1 است. به علاوه سیگنال در ناحیه 105/2 ppm کربن آنومری بتا-دی-زایلوپیرانوز با اتصال 1→1 (انتهای غیر احیاء کننده) را نشان می دهد. علت شناسایی واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده با اشکال آنومری نوع بتا (β) این است که کربن آنومری نوع آلفا (α) برای واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده در محدوده 100-101 ppm ظاهر می شود و بالاتر بودن مقادیر جابجایی شیمیایی دیده شده برای واحدهای مونومری نامبرده نشان دهنده وجود شکل آنومری بتا (β) می باشد. در همین راستا، مشاهده سیگنال در 101/3 ppm نشان می دهد که واحدهای رامنوز به شکل آنومری آلفا (α) وجود دارند. همچنین استنباط شد که تمام واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده دارای اشکال پیرانوزی هستند و تنها استثناء آرابینوز است که به شکل فورانوزی در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص وجود دارد زیرا سیگنال کربن شماره 1 (آنومری) شکل فورانوزی قندها در محدوده 105-110 ppm ظاهر می شود. لذا وجود سیگنال آنومری در ناحیه 109/5 ppm بیانگر این واقعیت است که آلفا-ال-آرابینوفورانوز با اتصال (3→1) در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص وجود دارد. لازم به ذکر است که سیگنال کربن آنومری بتا آرابینوفورانوز بسیار کمتر از 109 ppm (حدود 103 ppm) است.

نتایج حاصل از طیف NMR تک بعدی پلی ساکارید کاملاً خالص با نتایج حاصل از آزمون های متیله کردن، اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت، طیف مادون قرمز و نیز کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری ذکر شده کاملاً سازگاری داشت.

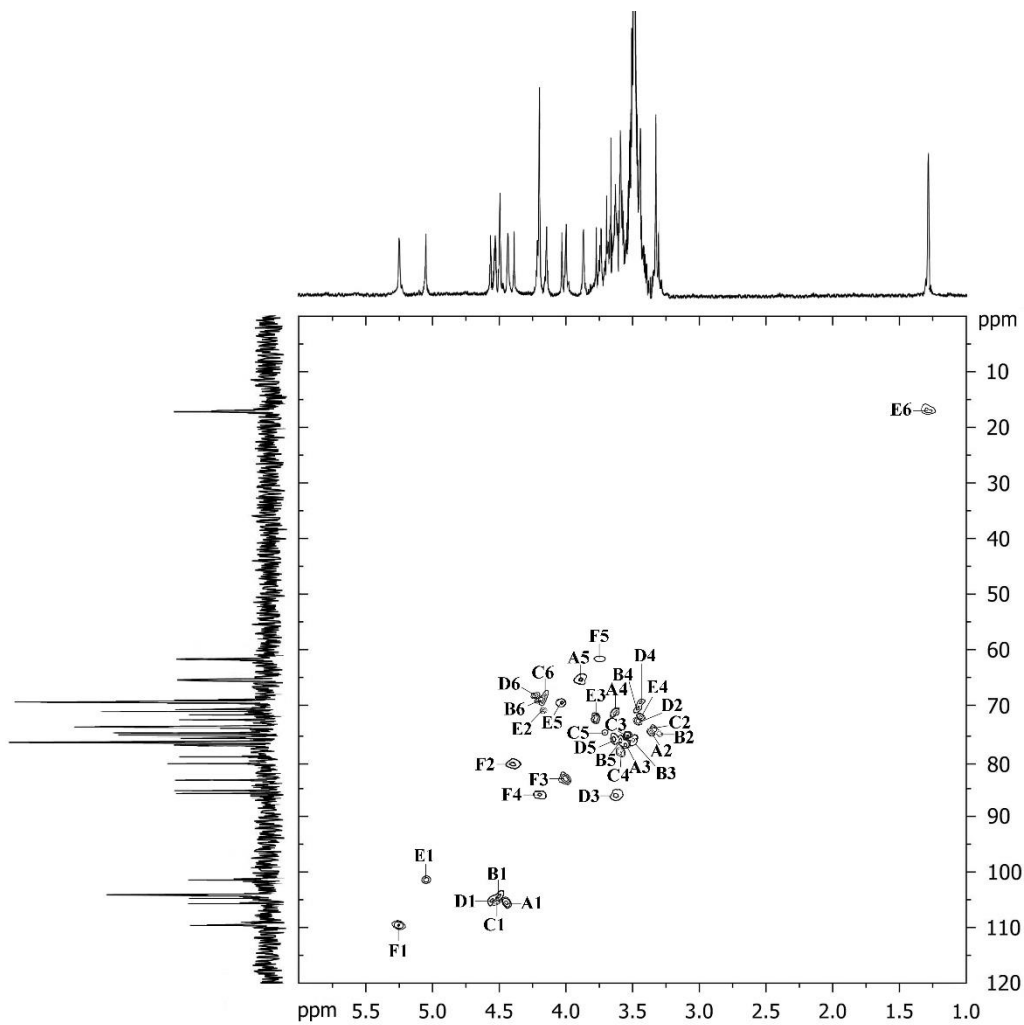
به منظور پی بردن به سیگنال های مربوط به تمام پروتون ها و نیز کربن های متناظر با آن ها در اجزای A تا F، به ترتیب از طیف های NMR دو بعدی ^1H - ^1H COSY (شکل 4-6) و ^1H - ^{13}C HMQC (شکل 4-7) استفاده شد.



شکل 4-6: طیف ^1H - ^1H COSY پلی ساکارید خالص

با استفاده از شکل 4-6 می توان تمام پروتون های مجاور یکدیگر را در هر یک از اجزای A تا F شناسایی کرد و این کار برای نمونه برای جزء A در روی شکل 4-6 مشخص شده است. با دستیابی به سیگنال پروتون

های حاصل از شکل 4-6 برای هر کدام از اجزاء می توان کربن-13 متناظر با آن ها را از طیف $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC پیدا نمود. همانطور که در شکل 4-7 مشخص شده است، سیگنال های کربن های متناظر با هر پروتون در مورد تمام اجزای A تا F کاملاً تفکیک و متمایز شده اند که نتایج آن در جدول 4-4 آورده شده است.



شکل 4-7: طیف $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC پلی ساکارید خالص

جدول 4-4: مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون و کربن پلی ساکارید خالص

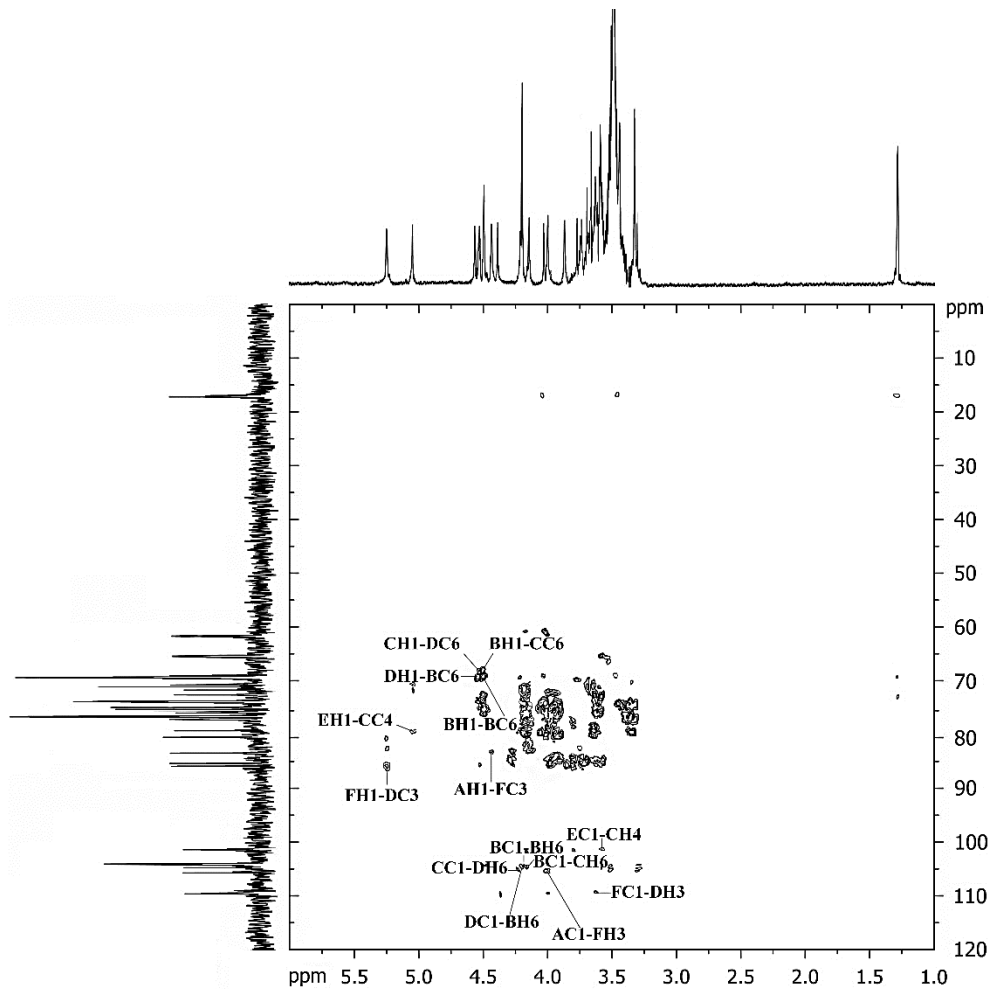
جا بجایی شیمیایی δ (ppm)						نوع اتصال	جزء
C-6	C-5	C-4	C-3	C-2	C-1		
(H-6)	(H-5)	(H-4)	(H-3)	(H-2)	(H-1)		
-	65/3	71/0	76/5	74/6	105/2	β -D-Xylp-(1 \rightarrow	A
(-)	(3/87)	(3/66)	(3/51)	(3/32)	(4/43)		
69/3	75/9	70/2	76/0	73/6	104/0	\rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	B
(4/20)	(3/61)	(3/48)	(3/50)	(3/31)	(4/50)		
69/1	74/8	78/7	74/5	73/7	104/5	\rightarrow 4,6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	C
(4/19)	(3/70)	(3/61)	(3/52)	(3/29)	(4/52)		
69/2	75/7	69/9	85/5	73/2	104/2	\rightarrow 3,6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	D
(4/21)	(3/65)	(3/45)	(3/63)	(3/49)	(4/56)		
17/1	69/5	72/3	71/6	70/9	101/3	α -L-Rhap-(1 \rightarrow	E
(1/27)	(4/03)	(3/46)	(3/78)	(4/15)	(5/05)		
-	61/9	85/5	83/2	80/0	109/5	\rightarrow 3)- α -L-Araf-(1 \rightarrow	F
(-)	(3/75)	(4/23)	(4/00)	(4/39)	(5/25)		

اجزای A تا F در جدول 4-4 بر حسب نوع مونوساکارید و نیز نوع اتصال آن ها از یکدیگر تفکیک شده اند. وجود سیگنال در 78/7 و 85/5 ppm به ترتیب کربن های شماره 4 و 3 گلوکز را در نقاط اتصال نشان می

دهد. سیگنال در ppm 83/2 مربوط به اتصال کربن شماره 3 آرابینوز است و سیگنال ppm 17/1 مربوط به کربن شماره 6 رامنوز می باشد.

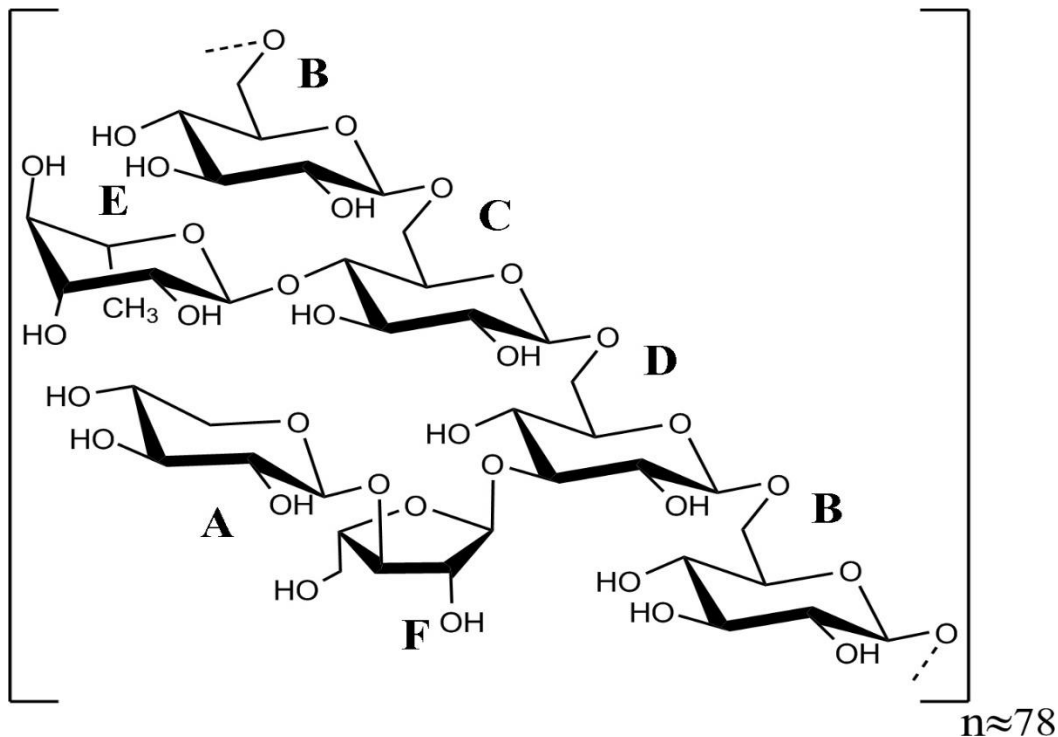
برای شناسایی سکانس های موجود در ساختار پلی ساکارید کاملاً خالص، نحوه اتصال واحدهای مونومری A تا F به یکدیگر و در نهایت شناسایی کامل ساختار پلی ساکارید شکر تیغال سفالوتس از طیف HMBC (شکل 4-8) استفاده شد. با مشاهده شکل 4-8، همبستگی بین اجزای A تا F به شرح زیر تعیین گردید.

وجود همبستگی بین پروتون شماره 1 جزء B و کربن شماره 6 جزء C و نیز کربن شماره 1 جزء B و پروتون شماره 6 جزء C نشان می دهد که جزء B از طریق پیوند 1→6 به جزء C متصل شده است. مشاهده همبستگی بین پروتون شماره 1 جزء C و کربن شماره 6 جزء D و نیز کربن شماره 1 جزء C و پروتون شماره 6 جزء D بیانگر این است که جزء C از طریق پیوند 1→6 به جزء D متصل شده است. همچنین وجود همبستگی پروتون شماره 1 جزء D و کربن شماره 6 جزء B و نیز بین کربن شماره 1 جزء D و پروتون شماره 6 جزء B نشان می دهد که جزء D از طریق پیوند 1→6 به جزء B متصل شده است. مشاهده همبستگی بین پروتون شماره 1 به کربن شماره 6 جزء B و نیز بین کربن شماره 1 جزء B و پروتون شماره 6 جزء B نشان می دهد که اتصال 1→6 بین اجزای B وجود دارد. مشاهده همبستگی بین پروتون شماره 1 جزء E و کربن شماره 4 جزء C و نیز بین کربن شماره 1 جزء E و پروتون شماره 4 جزء C بیانگر اتصال جزء E به جزء C از طریق پیوند 1→4 است.



شکل 4-8: طیف HMBC پلی ساکارید خالص

مشاهده همبستگی بین پروتون شماره 1 جزء F و کربن شماره 3 جزء D و نیز بین کربن شماره 1 جزء F و پروتون شماره 3 جزء D نشان می دهد که از طریق پیوند 1→3 به جزء D متصل است. و در نهایت وجود همبستگی بین پروتون شماره 1 جزء A با کربن شماره 3 جزء F و نیز بین کربن شماره 1 جزء A و پروتون شماره 3 جزء F نشان می دهد که از طریق پیوند 1→3 به جزء F متصل است. همبستگی دیگری بین اجزای A و E با سایر اجزا مشاهده نشد که نشان می دهد اجزای A و E در انتهای شاخه های جانبی پلی ساکارید کاملاً خالص قرار گرفته اند.



شکل 4-9: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص ریشه های شکر تیغال سفالوتس

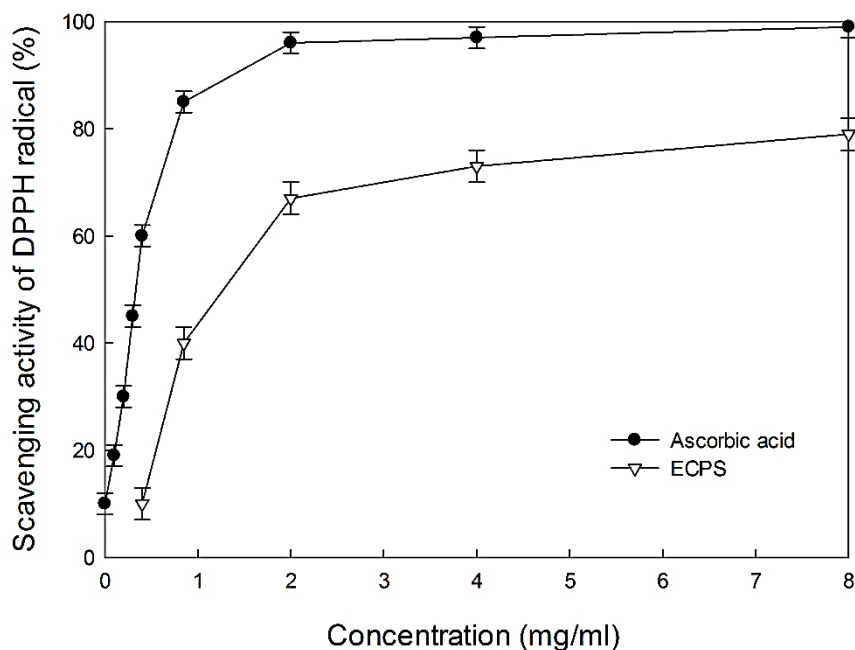
با جمع بندی نتایج حاصل از تمام آزمون های شیمیایی و آنالیز دستگاهی، ساختار پیشنهادی برای پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس در شکل 4-9 مشخص شده است.

در بین گونه های شکر تیغال شناسایی شده حسینیان در سال 1397 ساختار پلی ساکارید شکر تیغال نیش دار را ترسیم کرد و دریافت که پلی ساکارید موجود از اسکلت اصلی با واحدهای گلوکز با اتصالات 1→6 و 1→4 و 6→4 تشکیل شده است و در محل کربن شماره 4 گلوکز شاخه جانبی متشکل از بتا-دی-زایلوپیرانوز (1→4) و بتا-دی-زایلوپیرانوز (1→) و همچنین شاخه جانبی دیگری متشکل از بتا-دی-مانوپیرانوز (1→4) و بتا-ال-آرابینوپیرانوز (1→4) و آلفا-دی-گالاکتوپیرانوز (1→) قرار گرفته است. از این رو می

توان نتیجه گرفت که پلی ساکارید گونه سفالوتس از نظر واحدهای سازنده و نیز نوع اتصالات با گونه نیش دار متفاوت است.

10-4- فعالیت ضد اکسندگی رادیکال DPPH

از روش های مرسوم مورد استفاده در ارزیابی فعالیت ضد اکسندگی ترکیبات طبیعی، استفاده از خاصیت مهارکنندگی رادیکال مقاوم DPPH است. اساس این روش احیاء محلول متانولی رادیکال DPPH در 517 نانومتر و در حضور ضد اکسندگی های اهدا کننده یون هیدروژن است که در نتیجه این واکنش، شکل غیر رادیکال DPPH-H حاصل می شود. از مزایای این روش می توان به استفاده از آن برای تعداد زیادی نمونه در مدت زمان کوتاه اشاره کرد. به علاوه این روش جهت استفاده برای مقادیر نمونه با غلظت های پایین حساسیت لازم را دارد. شکل 4-10 اثر مهارکنندگی پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس (ECPS) را در مقایسه با اسید آسکوربیک که به عنوان شاهد در این آزمون استفاده شده است، در غلظت های مختلف نشان می دهد.



شکل 4-10: اثر مهارکنندگی پلی ساکارید خالص روی رادیکال های

با مراجعه به شکل می توان نتیجه گرفت که اثر مهارکنندگی پلی ساکارید کاملاً خالص روی رادیکال های DPPH به غلظت وابسته است و با افزایش غلظت این اثر زیاد می شود و در غلظت 8 میلی گرم بر میلی لیتر به 79٪ می رسد. اثر مهارکنندگی پلی ساکارید شکر تیغال سفالوتس در مقایسه با شکر تیغال نیش دار (71٪) بیشتر بود و مقدار EC₅₀ برای پلی ساکارید کاملاً خالص در این تحقیق 1/26 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد که از مقدار EC₅₀ شکر تیغال نیش دار (1/91) کمتر بود و نشان می دهد که برای مهار کردن 50 درصدی رادیکال DPPH به غلظت کمتری از پلی ساکارید کاملاً خالص شکر تیغال سفالوتس در مقایسه با گونه نیش دار نیاز است (حسینیان، 1397). با این وجود در مقایسه با سایر ضد اکسنده های طبیعی با تاثیر قابل توجه، پلی ساکارید کاملاً خالص حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس فعالیت ضد اکسندگی قابل توجهی نداشت و اثر مهارکنندگی آن روی رادیکال های DPPH در غلظت های یکسان کمتر از اسید آسکوربیک بود.

نتیجه گیری کلی:

در این پژوهش پلی ساکارید خام حاصل از ریشه های شکر تیغال سفالوتس پس از فرایند استخراج توسط آب داغ 80°C، پروتئین زدایی به روش سواگ و ترسیب با اتانول، با استفاده از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل-سلولز و سفادکس جی-100 خالص سازی شد. پلی ساکارید خالص حاوی 96/9٪ قند و فاقد پروتئین بود. میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه شکر تیغال سفالوتس 82/4 کیلودالتون و پیک آن کاملاً متقارن و همگن بود. ساختار پلی ساکارید خالص با استفاده از روش های شیمیایی و دستگاهی مانند متیله کردن، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا و طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای بررسی شد. با تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده مشخص شد که پلی ساکارید حاصل

از اسکلت اصلی با واحدهای بتا-د-گلوکوپیرانوز با اتصالات 1→6، 1→4و6 و 1→3و6 تشکیل شده است و در محل کربن شماره 3 بتا-د-گلوکوپیرانوز (1→3و6) یک شاخه جانبی متشکل از آلفا-ال-آرابینوفورانوز (1→3) و بتا-د-زایلوپیرانوز (1→) و در محل کربن شماره 4 بتا-د-گلوکوپیرانوز (1→4و6) شاخه جانبی دیگر از آلفا-ال-رامنوپیرانوز (1→) قرار دارند. در نهایت نیز از خاصیت به دام اندازی رادیکال های DPPH برای بررسی خاصیت ضد اکسندگی این پلی ساکارید استفاده شد که مشخص شد خاصیت ضد اکسندگی در این پلی ساکارید وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت این خاصیت افزایش می یابد اما به طور کلی این پلی ساکارید در غلظت های یکسان با اسید آسکوربیک خاصیت ضد اکسندگی کمتری از خود نشان داد.

همان طور که در بخش کلیات بحث شد، شناسایی ساختار پلی ساکاریدها از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا نوع ساختار این ترکیبات بر روی نقش و عملکرد آن ها تاثیر بسزایی دارد. از آن جایی که گیاه شکر تیغال به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرد می توان با انجام آزمایشات بیشتر پتانسیل بالای گونه های مختلف این گیاه را برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی ثابت کرد.

فصل پنجم

منابع

منابع

آئینه چینی، (1370)، "مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران"، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه 1196.

باقری، ا، مختاری، ط، حسینی نیا، ا، شنوایی، م، (1391)، "بررسی اثر حلال عصاره گیری بر عملکرد کمی و کیفی تانن عصاره نعنا فلفلی"، همایش ملی فراورده های طبیعی و گیاهان دارویی بجنورد، دانشگاه پزشکی خراسان شمالی.

بی نام، (1396)، "آمارنامه کشاورزی"، جلد دوم، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی.

تکاور، س، محمدی، م، (1387)، "عوامل مولد و ساز و کار تولید شیرابه های قندی (مان) در ایران"، فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی، جلد 4، شماره 28، صفحات 28-37.

جهان بین ک، (1390)، رساله دکترا: "استخراج، شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب حاصل از ریشه گیاه چوبک تماشایی"، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

حامدی، ج، ایمان پرست، ف، ایمانی، م، صدرای، س، (1393)، "کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کاربردهای آن در زیست فناوری"، مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

حسینی، ز، (۱۳۸۶)، "روش های متداول در تجزیه ی مواد غذایی"، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه شیراز.

حسینیان، م، (1397)، پایان نامه ارشد: "بررسی ساختار و فعالیت ضد اکسندگی پلی ساکارید غالب محلول در آب ریشه شکر تیغال نیش دار"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

ذوقی، آ، (۱۳۹۵)، پایان نامه ارشد: "مطالعه ساختاری پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه گون نوک خمیده"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

خانوی، م، حاجی آخوندی، ع، امین غ، شمس اردکانی، م، (1389)، "نگرشی بر جاذبه های گیاهان دارویی در ایران و جهان"، فصلنامه طب سنتی اسلام و ایران، شماره 1، صفحات 55-58.

ربانی چادگانی ع، (۱۳۷۲)، "مبانی بیوشیمی"، انتشارات دانشگاه تهران.

رحمن ع، حسینی س، اوتادی م، (1392)، "بررسی اثر نمک (کلرید کلسیم، منیزیم و پتاسیم)، چربی و صمغ

ژلان بر بافت سوسیس"، مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی، شماره 1، صفحات 1-11.

رستمی ز، طبرسا م، رضایی م، (1395)، "ساختار شیمیایی و خواص بیولوژیک پلی ساکاریدهای سولفات

استخراج شده از جلبک های دریایی سبز"، فصلنامه علمی-پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، شماره 1،

صفحات 97-116.

زرگری ع، (1370)، "گیاهان دارویی"، جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات 49-51.

زندى پ (مترجم)، فاکس ب.ا، کامرون آ.ج (نویسنده)، (۱۳۷۵)، "علوم غذایی از دیدگاه شیمیایی"، چاپ دوم،

مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

صحراگردن، (1395)، پایان نامه ارشد: "تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه

تمشک برگ نارونی"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

ضیائی ف، (۱۳۹۲)، "کاربرد رزونانس مغناطیسی هسته در پلیمرها"، چاپ اول، انتشارات پژوهشگاه پلیمر و

پتروشیمی ایران.

علیزاده ن، (1396)، پایان نامه ارشد: "تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ساقه های گیاه

هوم"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

عماد م، (1379)، "شناسایی گیاهان دارویی و صنعتی جنگلی و مرتعی و موارد مصرف آن ها"، چاپ اول،

انتشارات مؤسسه توسعه روستایی.

فاضلی م، (1395)، پایان نامه ارشد: "مطالعه نظری مکانیزمهای مختلف توانایی آنتی اکسیدانی برخی از پلی

ساکاریدهای طبیعی"، دانشکده شیمی و فیزیک، دانشگاه الزهرا.

قهرمان ا، (1361)، "فلور رنگی ایران"، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع.

کلانترع، بیرانوند س، محمدی ح، فرجی ط، شهسواری س، هخامنش س، (1389)، "اورئوبازیدیوم پولولنس (یک شبه مخمر)، کاربرد و اهمیت آن"، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، جلد 15، صفحات 89-98.

مسعودپور م، (1395)، پایان نامه ارشد: "بررسی فرایند حرارتی بر پایداری و خواص پلی ساکارید زیست فعال بلوط"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

مظفریان و، (۱۳۸۰)، رساله دکترا: "بررسی تاکزونومیک جنس شکر تیغال (*Echinops L.*) در ایران"، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

میر محمد صادقی م، سعیدی م، هروی م، (ترجمه). ولهارد ک.پ، شور ن.ای، (1392)، "شیمی آلی ساختار و کاربرد"، جلد دوم، چاپ سوم، انتشارات نورپردازان تهران.

میرحیدر ح، (1373)، "معارف گیاهی"، جلد ششم، دفتر نشر فرهنگ اسلامی، صفحه 747.

نبی کلجاهی م، (1397)، پایان نامه ارشد: "استخراج، خالص سازی و شناسایی ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از ریشه های فریون شنی (*Euphorbia seguieriana*)"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

نصیرزاده ع، جاویدتاش ا، ریاست م، (1384)، "شناسایی گونه های شکر تیغال و بررسی برخی از ویژگی های زیستی سر خرطومی مولد مان (*Larinus vulper olive.*) در استان فارس"، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، شماره 3، صفحات 335-346.

Andersson, R., Westerlund, E., Aman, P., & Eliasson, A. (2006). *Cell-wall polysaccharides: Structural, chemical, and analytical aspects. Carbohydrates in food.* CRC Press U.S.

Azmir J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2013). *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.* Journal of Food Engineering, 117, 426-436.

- Beigi, M., & Jahanbin, K. (2019). *A water-soluble polysaccharide from the roots of Eremurus spectabilis M. B. subsp. Spectabilis: Extraction, purification and structural features*. International Journal of Biological Macromolecules, 128, 648-654.
- Bemiller, J.M., & Huber, K.C. (2008). *Carbohydrates*. In: *Fennema's food chemistry*. CRC Press.
- Benhura, M.A.N., & Chidewe, C. (2002). *Some properties of a polysaccharide preparation that is isolated from the fruit of Cordia abyssinica*. Food Chemistry, 76 (3), 343-347.
- Bin, B., Huijan, W., Hongwei, W., Songshan, S., & Shunchun, W. (2014). *Structural characterization of one homogeneous polysaccharide from echinops latifolius Tausch. and anti-complementary activity of its sulfated derivatives*. Chemical Journal of Chinese Universities, 35, 2119-2123.
- Blanshard, J.M.V., & Mitchell, J.R. (2013). *Polysaccharides in food*. Elsevier.
- Bouaziz, F., Koubaa, M., Helbert, C.B., Kallel, F., Driss, D., Kacem, I., Ghorbel, R., & Chaabouni, S.E. (2014). *Purification, structural data and biological properties of polysaccharide from Prunus amygdalus gum*. International Journal of Food Science Technology, 50(3), 578-584.
- Carraher, C.E. (2000). *Seymour/Carraher's polymer chemistry*. New York: Marcel Dekker.
- Change, C.T., Yang J.T., & Hsu, M.T., (1990). *Study on the natural pesticidal components in Echinops grijissi*. Planta-Medica, 56, 533.
- Chaudhuri, P.K. (1988). *Constituents of the flowers of Echinops echinatus*. Fitoterapia, 59, 150-151.
- Cui, S.W. (2005). *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. CRC Press.
- Deman, J.M. (1999). *Principles of food chemistry*. Aspen.
- Dong, C.X., Hayashi, k., Lee, J.B., & Hayashi, T. (2010). *Characterization of structures and antiviral effects of polysaccharides from Portulaca oleracea L*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 58(4), 507-510.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry, 28(3), 350-356.

- Erenler, R., Yilmaz, S., Aksit, H., Sen, O., Genc, N., Elmastas, M., & Demirtas, I. (2013). *Antioxidant activities of chemical constituents isolated from Echinops orientalis Trauv.* Records of natural products, 8(1), 32-36.
- Fathi, M., Mohebbi, M., & Koocheki, A. (2016). *Introducing prunus cerasus gum exudates: chemical structure, molecular weight, and rheological properties.* Food Hydrocolloids, 61, 946-955.
- Fokialakis, N., Osbrink, W.L., Mamonov, L.K., Gemejeva, N.G., Mims, A.B., Skaltsounis, A.L., Lax, A.R., & Cantrell, C.L. (2006). *Antifeedant and toxicity effects of thiophenes from four Echinops species against the Formosan subterranean termite, Coptotermes formosanus.* Pest Management Science, 62, 832-838.
- Guo, Q., Cui, S., Wang, Q., Hu, X., Kang, J., & Yada, R. (2012). *Structural characterization of a low- molecular-weight heteropolysaccharide (glucomannan) isolated from Artemisia sphaerocephala Krasch.* Carbohydrate Research, 350, 31-39.
- Guo, R., Ai, L., Cao, N., Ma, J., Wu, Y., Wu, J., & Sun, X. (2016). *Physicochemical properties and structural characterization of a galactomannan from Sophora alopecuroides L. seeds.* Carbohydrate Polymers, 140, 451-460.
- Hamed, A., Farjadian, S., & Karami, A.M. (2015). *Immunomodulatory properties of trehala manna decoction and its isolated carbohydrate macromolecules.* Journal of ethnopharmacology, 162, 121-126.
- He, P.F., He, L., Zhang, A.Q., Wang, X.L., Qu, L., & Sun, P.L. (2017). *Structure and chain conformation of a neutral polysaccharide from sclerotia of Polyporus umbellatus.* Carbohydrate Polymers, 155, 61-67.
- Heinze, T., Schwikal, K., & Barthel, S. (2005). *Ionic liquids as reaction, medium in cellulose functionalization.* Macromolecular Bioscience, 5(6), 520-525.
- Henniger, G. (1998). *Enzymic methods of food analysis. In: Analytical methods of food authentication.* Blackie Academic and Professional.
- Hollósy, F. (2002). *Effects of ultraviolet radiation on plant cells.* Micron, 33(2), 179-197.
- Horvath, Z., Gyemant, G., & Nanasi, P. (1998). *Investigation of polysaccharides of Echinops species. Medicinal plant polysaccharides.* Acta Pharmaceutica Hungarica, 68, 214-219.

- Hu, H.B., Liang, H.P., Li, H.M., Yuan, R.N., Sun, J., Zhang, L.L., Han, M.H., & Wu, Y. (2018). *Isolation, purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from the stem barks of Acanthopanax leucorrhizus*. Carbohydrate Polymers, 196, 359-367.
- Hu, J.F., Gen, M.Y., Zhang, J.T., & Jiang, H.D. (2001). *An in vitro study of the structure-activity relationships of sulfated polysaccharide from brown Algae to its antioxidant effect*. Journal of Asian Natural Products Research, 3(4), 353-358.
- Huang, D., Zhang, M., Chen, W., Zhang, D., Wang, X., Cao, H., Zhang, Q., & Yan, C. (2018). *Structural elucidation and osteogenic activities of two novel heteropolysaccharides obtained from water extraction residues of Cibotium barometz*. Industrial Crops and Products, 121, 216-225.
- Jahanbin, K. (2018). *Structural characterization of a new water-soluble polysaccharide isolated from Acanthophyllum acerosum roots and its antioxidant activity*. International Journal of Biological Macromolecules, 107, 1227-1234.
- Jahanbin, K., Abbasian, A., & Ahang, M. (2017). *Isolation, purification and structural characterization of a new water-soluble polysaccharide from Eremurus stenophyllus (boiss. & buhse) baker roots*. Carbohydrate Polymers, 178, 386-393.
- Jahanbin, k., Gohari, A.R., Moini, S., Emam-Djomeh, Z., & Masi, P. (2011). *Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from Acanthophyllum bracteatum roots*. International Journal of Biological Macromolecules, 49, 567-572.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H.S. (2011). *Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine Algae*. Marine Drugs, 9, 196-223.
- Jin, M., Lu, Z., Huang, M., & Wang, Y. (2011). *Sulfated modification and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by Enterobacter cloacae Z0206*. International Journal of Biological Macromolecules, 48, 607-612.

- Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xu, C., & Shang, P. (2012). *Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from Angelica sinensis (Oliv.) Diels: A review*. Carbohydrate Polymers, 89, 713-722.
- Karam, M., & Hamed, A. (2012). *Structure elucidation of water-soluble polysaccharides of Trehala Manna*. Research in Pharmaceutical Sciences, 7(5).
- Khadim, E.J., Abdulrasool, A.A., & Awad, Z.J. (2014). *Phytochemical investigation of alkaloids in the Iraqi Echinops heterophyllus*. Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences, 23(1), 26-34
- Kolsi, R.B.A., Fakhfakh, J., Krichen, F., Jribi, I., Chiarore, A., Patti, F.P., Blecker, C., Allouche, N., Belghith, H., & Belghith, K. (2016). *Structural characterization and functional properties of antihypertensive Cymodocea nodosa sulfated polysaccharide*. Carbohydrate Polymers, 151, 511-522.
- Kristiansen, K. A., Potthast, A., & Christensen, B. E. (2010). *Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties*. Carbohydrate Research, 345(10), 1264-1271.
- Lapasin, R., & Prici, S. (1995). *Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications*. Springer U.S.
- Li, N., Liu, X., He, X., Wang, S., Cao, S., Xia, Z., Xian, H., Qin, L., & Mao, W. (2017). *Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed Monostroma angicava*. Carbohydrate Polymers, 159, 195-206.
- Liu, W., Lu, W., Chai, Y., Liu, Y., Yao, W., & Gao, X. (2017). *Preliminary structural characterization and hypoglycemic effects of an acidic polysaccharide SERP1 from the residue of Sarcandra glabra*. Carbohydrate Polymers, 176, 140-151.
- Luo, X., Duan, Y., Yang, W., Zhang, H., Li, C., & Zhang, J. (2017). *Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by subcritical water extraction from Cordyceps militaris*. Carbohydrate Polymers, 157, 794-802.
- Ma, T., Sun, X., Tian, C., Luo, J., Zheng, C., & Zhan, J. (2016). *Polysaccharide extraction from Sphallerocarpus gracilis roots by response surface methodology*. International journal of biological macromolecules, 88, 162-170.

- Maran, J. P., & Priya, B. (2014). *Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from Nephelium lappaceum L. fruit peel*. International Journal of Biological Macromolecules, 70, 530-536.
- Mccleary, B.V., & Masethon, N.K. (1987). *Enzymic analysis of Polysaccharide Structure. Vol 44. In: Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Academic Press.
- Melton L.D., & Smith B.G. (2001). *Determination of neutral sugars by gas chromatography of their alditol acetates. Unit E3.2. Handbook of food analytical chemistry*. John Wiley and Sons.
- Muralikrishna, G., & Subba Rao, M.V.S.S.T. (2007). *Cereal non-cellulosic polysaccharides: structure and function relationship-an overview*. Critical Reviews In Food Science and Nutrition, 47(6), 599-610.
- Nakano, H., Ali, A., Rehman, J.U., Mamonov, L.K., Cantrell, C.L., & Khan, I.L. (2014). *Toxicity of thiophenes from Echinops transiliensis (Asteraceae) against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Larvae*. Chemistry and Biodiversity, 11(7), 1001-1009.
- Nie, S., Cui, S.W., & Xie, M. (2018). *Bioactive polysaccharides*. Academic press an imprint of Elsevier.
- Nn, A. (2015). *A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation*. Medicinal and Aromatic Plants, 4(3), 3-8.
- Popa, V. (2011). *Polysaccharides in medicinal and pharmaceutical application*. Smithers Rapra Technology.
- Quan, H., Qiong-Yao, Y., Jiang, S., Chang-Yun, X., Ze-Jie, L., & Pu-Ming, H. (2011). *Structural characterization and antioxidant activities of 2 water-soluble polysaccharide fractions purified from Tea (Camellia sinensis) flower*. Journal of Food Science, 76(3), 462-471.
- Rassi, Z.E. (1995). *Carbohydrate analysis: High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*. Elsevier.
- RosiK, J., Zitko, V., & Kubala, J. (1966). *Structure of sour cherry-tree gum (Prunus cerasus L.)*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 31.
- Sahragard, N., & Jahanbin, K. (2017). *Structural elucidation of the main water-soluble polysaccharide from Rubus anatolicus roots*. Carbohydrate Polymers, 175, 610-617.

- Sarvaiya, D.D., Sheth, N.R., & Dudhrejya, A.V. (2017). *Antidiabetic and antioxidant activity of roots of Echinops echinatus roxb.* Pharmacology Online, 2, 10-39.
- Senejoux, F., Demougeot, C., Karimov, U., Muyard, F., Kerramb, P., Aisa, H.A., & Girard-Thernier, C. (2013). *Chemical constituents from Echinops integrifolius.* Biochem Systematics and Ecology, 47, 42-44.
- Shabani, H., Askari, G., Jahanbin, K., & Khodaeian, F. (2016). *Evaluation of physicochemical characteristics and antioxidant property of Prunus avium gum exudates.* International Journal of Biological Macromolecules, 93, 436-441.
- Simas, F.F., Gorin, P.A.J., Wagner, R., Sasaki, G.L., Bonkerner, A., & Iacomini, M. (2008). *Comparison of structure of gum exudate polysaccharides from the trunk and fruit of the peach tree (Prunus persica).* Carbohydrate Polymers, 71, 218-228.
- Singh, U.P., Pandey, V.B., Singh, K.N., & Singh, R.D.N. (1988). *Antifungal activity of some new flavones and flavone glycosides of Echinops echinatus.* Canadian Journal of Botany, 66, 1901-1903.
- Sinnott, M. (2007). *Carbohydrate chemistry and biochemistry: structure and mechanism.* Royal society of chemistry.
- Smith, R.M. (2003). *Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques.* Journal of Chromatography A, 1000(1), 3-27.
- Staub, A. (1965). *Removal of protein-Sevag method.* Methods in carbohydrate chemistry, 5(2), 5-6.
- Stephen, A.M. (1995). *Food polysaccharides and their applications.* CRC Press, Inc.
- Stock, R., & Rice, C.B.F. (1974). *Chromatographic methods.* Chapman and Hall.
- Toroglu, S., Keskin, D., Vural, C., Kertmen, M., & Cenet, M. (2012). *Camparison of antimicrobial activity of Echinops viscosus subsp. Bithynicus and E. microcephalus leaves and flowers extracts from Turkey.* International Journal of Agriculture and Biology, 14, 637-640.
- Tu, W., Zhu, J., Bi, S., Chen, D., Song, L., Wang, L., Zi, J., & Yu, R. (2016). *Isolation, characterization and bioactivities of a new polysaccharide from Annona squamosa and its sulfated derivative.* Carbohydrate Polymers, 152, 287-296.

- Ulvskov, P. (2010). *Annual Plant Reviews, Plant Polysaccharides: Biosynthesis and Bioengineering*. John Wiley and Sons.
- Vidanarachchi, J.K., Iji, P.A., Mikkelsen, L.L., Sims, I., & Choct, M. (2009). *Isolation and characterization of water-soluble prebiotic compounds from Australian and NewZealand plants*. *Carbohydrate Polymers*, 77, 670-676.
- Walford, S.N. (2010). *Gc-Ms as a tool for carbohydrate analysis in a research environment*. *Proceedings - International Society of Sugar Cane Technologists*, 27, 1-15.
- Walker C., Reamy B.V. (2009). *Diets for cardiovascular disease prevention: what is the evidence?* *American Family Physician*, 79, 8-571.
- Walter, R. (1998). *Polysaccharide association structures in food*. Marcel Dekker, Inc.
- Wolf, W.J. (1969). *Soybean protein nomenclature: a progress report*. *Journal of Cereal Science*, 14(3), 75-78.
- Wrolstad, R.E. (2012). *Food carbohydrate chemistry*. John Wiley and Sons.
- Xia, Y.g., Wang, Q.h., Liang, J., Yang, B.y., Li, G.y., & Kuang, H.x. (2011). *Development and application of a rapid and efficient CZE method coupled with correction factors for determination of monosaccharide composition of acidic hetero-polysaccharides from Ephedra sinica*. *Phytochemical Analysis*, 22(2), 103-111.
- Yang, L., & Zhang, L.M. (2009). *Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources*. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 349-361.
- Yin, C., Fan, X., Fan, Z., Shi, D., & Gao, H. (2017). *Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of Lentinuse edodes polysaccharides and determination of its antioxidant activity*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 446-454.
- Yu, X.H., Liu, Y., Wu, X.L., Liu, L.Z., Fu, W., & Song, D.D. (2017). *Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from American ginseng*. *Carbohydrate Polymers*, 156, 9-18.

- Yu, Z., Ming, G., Kaiping, W., Zhixiang, C., Liquan, D., Jingyu, L., & Fang, Z. (2010). *Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from Lentinus edodes*. *Fitoterapia*, 81, 1163-1170.
- Yuan, Q., Xie, Y., Wang, W., Yan, Y., Ye, H., Jabbar, S., & Zeng, X. (2015). *Extraction optimization, characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from mulberry (Morus alba L.) leaves*. *Carbohydrate Polymers*, 128, 52-62.
- Zhang, X., Liu, L., & Lin, C. (2014). *Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste*. *Food Hydrocolloids*, 39, 10-18.
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., & Cheung, P.C.K. (2011). *Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities*. *Food Hydrocolloids*, 25, 196-206.
- Zhang, Y., Zhou, T., Wang, H., Cui, Z., Cheng, F., & Wang, K.p. (2016). *Structural characterization and in vitro antitumor activity of an acidic polysaccharide from Angelica sinensis (Oliv.) Diels*. *Carbohydrate Polymers*, 147, 401-408.

Abstract

A new water-soluble polysaccharide with molecular weight of 82.4 kDa and a specific optical rotation of $+19.5^\circ$ was extracted from the roots of *Echinops cephalotes* DC by hot water extraction (80°C). Purification of the polysaccharide was carried out by DEAE-cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. The total sugar content of purified polysaccharide was 96.9% and no protein and nucleic acid were detected in the polysaccharide. Monosaccharides analysis revealed that the purified polysaccharide of *E. cephalotes* DC roots was composed of Glucose, Arabinose, Xylose and Rhamnose with a relative molar ratio of 4.12, 98.0, 1.06 and 1.00 (4:1:1:1). Structure identification of polysaccharide was elucidated by a combination of methylation, partial acid hydrolysis, GC-MS analysis, periodate oxidation and smith degradation, FT-IR and NMR (1D and 2D) spectroscopy. The data obtained indicate that main chain consisted of (1 \rightarrow 6, 1 \rightarrow 4,6, 1 \rightarrow 3,6)- linked β -D-glucopyranose residues, with branches at *O*-3 position of β -D-glucopyranose consisting of α -L-arabinofuranose (1 \rightarrow 3) and β -D-xylopyranose (1 \rightarrow) and at *O*-4 position β -D-glucopyranose consisting of α -L-rhamnopyranose (1 \rightarrow). Antioxidant activity of this polysaccharide, was recognized by scavenging activity in the DPPH radicals, showed that it was concentration-dependent manner and was less than that of ascorbic acid at the same concentrations.

Keywords: Polysaccharides, Extraction and Purification, Structure determination, *Echinops cephalotes* DC, Antioxidant activity



Faculty of Agriculture
M.Sc. Thesis in Food Science

**Structural elucidation and antioxidant activity of a main
polysaccharide from *Echinops cephalotes* DC root.**

By: Sima Rezazadeh

Supervisor:
Dr. Kambiz Jahanbin

June 2019