بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه باغبانی و صنایع غذایی

استخراج، خالص‌سازی و تعیین ساختار پلی‌ساکارید غالب محلول در آب حاصل از ریشه سریش تماشایی بختیاری

معصومه بیگی

استاد راهنما:

دکتر کامبیز جهان‌بین

پایان‌نامهٔ ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

شهریور۱۳۹۴

دانشگاه شاهرود

دانشکده : کشاورزی

گروه : باغبانی و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای/ خانم .....

تحت عنوان:

در تاریخ ..... توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه ..... مورد پذیرش قرار گرفت.

اساتید راهنما	امضاء	اساتید مشاور	امضاء
نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :	

اساتید داور	امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء
نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :	
نام و نام خانوادگی :			
نام و نام خانوادگی :			
نام و نام خانوادگی :			

تقدیم اثر

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به ذات اقدسش، خدایی که آفرید جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را و آموخت مرا تا بیاموزم . . .

و به کسانی که عشقشان را در وجودم دمید. خانواده عزیزم، مهربان فرشتگانی که لحظات ناب باور بودن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست و هر چه بکوشم قطره ای از دریای بیکران مهربانیشان را سپاس نتوانم گفت، آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند حال این برگه سندی است تحفه درویش تقدیم به آنان . . .

خوبان همیشگی اند و ماندگار، مناسبت ها تنها بهانه ای است تا گوشه ای از سپاس ایشان را بجای آریم

تشکر و قدردانی

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستیمان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

از استاد بزرگوار و شایسته، جناب دکتر کابینیز جهان بین که با در اختیار قرار دادن تجارب ور، نمودهایشان مرا در پیشبرد این پژوهش یاری نمودند و فرصت آموزشی ارزشمندی را در اختیارم قرار دادند، کمال تشکر و قدردانی و امتنان را دارم.

از جناب آقای دکتر رجایی و دکتر صمدلویی که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند، کمال سپاس را دارم و تمام عزیزانی که بر پیشرفت علمی اینجانب تاثیر گذار بودند صمیمانه متشکرم.

معصومه بیگی - پاییز ۹۴

تعهدنامه

اینجانب **معصومه بیگی** دانشجوی دوره کارشناسی‌ارشد رشته **علوم و صنایع غذایی** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه شاهرود نویسنده پایان‌نامه "**استخراج، خالص‌سازی و تعیین ساختار پلی-ساکارید غالب محلول در آب حاصل از ریشه سریش تماشایی بختیاری**" تحت راهنمائی **آقای دکتر کامبیز جهان‌بین** متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام گردیده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ‌جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه شاهرود» و یا « University of Shahrood » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است، ضوابط و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت گردیده است.

تاریخ

امضاء دانشجو

چکیده:

گیاه سریش با نام علمی *Eremurus*، متعلق به خانواده لاله است. گونه تماشایی بختیاری از مهمترین گونه‌های جنس سریش است که در آسیای مرکزی شامل ایران، غرب پاکستان، افغانستان، عراق، ترکیه، فلسطین، لبنان، سوریه و قفقاز به خوبی رشد می‌کند. در این پژوهش پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی، با وزن مولکولی kDa ۴۷/۵ از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری، توسط استخراج با آب گرم ۶۰°C، پروتئین زدایی به روش سواگ و ترسیب با اتانول ۹۶٪ جدا شد. خالص‌سازی پلی‌ساکارید خام با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس G-100 انجام شد و جزء غالب خالص جمع آوری و خشک شد. راندمان تولید پلی ساکارید خالص از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری ۱/۴٪ بود. میزان قند کل پلی‌ساکارید کاملا خالص ۹۷/۲٪ و درجه چرخش نوری آن °۳۶/۶- محاسبه شد.

نتایج حاصل از آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص نشان داد که از واحدهای مونومری گلوکز و مانوز با نسبت‌های مولی ۱ به ۲/۹ تشکیل شده است. ساختار پلی‌ساکارید خالص توسط ترکیبی از روش‌های آنالیز شیمیایی و دستگاهی مانند متیلاسیون، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، طیف سنج مادون قرمز و رزونانس مغناطیس هسته اتم‌های کربن و پروتون صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد که اسکلت اصلی این پلی‌ساکارید از واحدهای مانوز و گلوکز با اتصال β(۱→۴) تشکیل شده است که در برخی از نقاط زنجیره اصلی از محل کربن شماره ۶ مانوز دارای انشعاب است و انشعابات توسط واحدهای مانوز به انتها می‌رسد.

کلمات کلیدی: پلی‌ساکارید، تعیین ساختار، استخراج و خالص‌سازی، سریش تماشایی بختیاری

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول..... ۱

۱- تعریف قندها.....۴

۱-۱-مونوساکارید ۴

۱-۲- پلی‌ساکارید ۶

۱-۳- نامگذاری قندها ۶

۱-۴- طبقه‌بندی پلی‌ساکاریدها..... ۹

۱-۵- کاربرد پلی‌ساکاریدها..... ۱۰

۱-۶- استخراج پلی‌ساکاریدها ۱۱

۱-۶-۱- عوامل موثر بر استخراج و حلالیت پلی‌ساکاریدها ۱۱

۱-۶-۲- روش‌های استخراج پلی‌ساکاریدها ۱۲

۱-۷- خالص‌سازی پلی‌ساکارید ۱۴

۱-۸- مرحله ترسیب..... ۲۰

۱-۹- تشخیص و شناسایی پلی‌ساکارید ۲۱

۱-۹-۱- روش‌های شیمیایی آنالیز پلی‌ساکارید ۲۲

۱-۹-۲- روش‌های طیف‌سنجی ۲۹

۱-۱۰- معرفی گیاه مورد مطالعه ۳۳

۱-۱۰-۱- جایگاه گیاه در جهان..... ۳۳

۱-۱۰-۲- موارد استعمال سریش به طریق سنتی ۳۷

۲- استخراج، خالص‌سازی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها ۴۷

۳-مواد اولیه و محلول‌های شیمیایی مورد استفاده ۶۶

۳-۱- جمع‌آوری ریشه‌های گیاه سریش تماشایی ۶۰

۳-۲- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده ۶۰

۳-۳- دستگاه‌های مورد استفاده ۶۰

۳-۴- روش‌کار ۶۲

۳-۴-۱- استخراج و جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه سریش تماشایی..... ۷۸

۳-۴-۲- خالص‌سازی پلی‌ساکا..... ۶۳

۳-۴-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه سریش تماشایی..... ۶۵

۴- نتایج و بحث..... ۷۴

۴-۱- استخراج، خالص‌سازی و شناسایی واحدهای سازنده پلی‌ساکاری..... ۷۴

۴-۱-۱- استخراج و خالص‌سازی ۷۴

۴-۱-۲- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید ۷۵

۴-۲-تعیین ساختار ۷۶

۴-۲-۱- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی‌ساکارید ۷۶

۴-۲-۲- تعیین درجه چرخش نوری..... ۷۸

۴-۲-۳- طیف مادون قرمز ۷۸

۴-۲-۴- هیدرولیز ناقص اسیدی ۷۹

۴-۲-۵- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت ۸۰

۴-۲-۶- آنالیز متیلاسیون ۸۱

۴-۲-۷- طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای ۸۲

فهرست شکل‌ها:

شکل ۱-۱: ساختار پیرانوز و فورانوز β-D-glucose و β-D-fructose ۲۰

شکل ۱-۲: نامگذاری نمادین برای هگزوزها و N-استیل هگزوآمین ۸

شکل ۱-۳: ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری ۳۶

شکل ۱-۴: تصویر شماتیک گیاه سریش تماشایی بختیاری ۳۶

شکل ۲-۱: ساختار پیشنهاد شده پلی‌ساکارید حاصل از گیاه آکانتوپاناکس براچیپوس ۴۰

شکل ۲-۲: ساختار پلی‌ساکارید خالص به دست آمده از ریشه گیاه تاکسوس یونانِنسیس .. ۴۹

شکل ۲-۳: ساختار پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش آنیسوپِتروس ۵۴

شکل ۲-۴: ساختار فراکشن خالص شده از ریشه گیاه سریش لاکتیفلوروس ۵۷

شکل ۲-۵: پلی‌ساکارید شناسایی شده از ریشه‌های گیاه سریش آلتائیکوس ۵۷

شکل ۴-۱: پلی‌ساکارید خالصِ حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری..... ۷۴

شکل ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه سریش تماشایی ۷۵

شکل ۴-۳: کروماتوگرام پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری با استفاده از **HPGPC** روی ستون **TSK-GEL G3000 PWXL** ۷۷

شکل ۴-۴: منحنی پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری پس از شستشو با ستون سفادکس جی-۱۰۰ ..... ۷۷

شکل ۴-۵: طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص گیاه سریش تماشایی بختیاری..... ۷۹

شکل ۴-۶: طیف NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص ریشه سریش تماشایی ۸۳

شکل ۴-۷: طیف NMR کربن-۱۳ پلی‌ساکارید خالص ۸۴

شکل ۴-۸: ساختار پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری ۸۵

فهرست جداول:

جدول ۱-۱: نام‌های مخفف و نمادین چند مونوساکارید ۵

جدول۱-۲: نامگذاری رایج، ساختار و منابع برخی از قندها ۷

جدول ۴-۱: نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه سریش تماشایی..... ۸۰

جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی آنالیز متیلاسیون پلی‌ساکارید خالص ریشه سریش تماشایی بختیاری..... ۸۲

جدول ۴-۳: مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص سریش تماشایی بختیاری ۸۳

جدول ۴-۴: طیف C-NMR پلی‌ساکارید خالص سریش تماشایی بختیاری.....۸۴

فصل اول

مقدّمه و کلیات

مقدمه:

گیاهان دارویی بدون شک از زمان‌هایی بسیار کهن مورد توجه انسان‌ها بوده‌اند، بطوریکه قدمت شناخت خواص آن‌ها، خارج از حافظه تاریخ است. استفاده از گیاهان دارویی با تاریخ زندگانی بشر همزمان بوده است. اگرچه آن‌ها همواره به عنوان منابع ارزشمند دارویی برای انسان مطرح هستند، ولی بررسی‌های علمی کافی بر روی آن‌ها انجام نشده است؛ در نتیجه گیاهان ناشناخته زیادی در جهان وجود دارد و بالطبع هزاران ترکیب جدید ناشناس موجود است که این مواد می‌توانند در صنایع مختلف از جمله صنایع مواد دارویی و غذایی بسیار سودمند باشند. با این حال در چند دهه گذشته استفاده از ترکیبات سنتزی به شدت رواج یافت که با پی بردن به اثرات جانبی مضر آنها، سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی شد.

ایران با داشتن چندین هزار گونه گیاه دارویی از لحاظ تنوع گیاهی در دنیا جایگاه ویژه‌ای دارد و می‌تواند ظرفیت قابل توجهی برای به دست آوردن بازارهای جهانی در این زمینه داشته باشد. سالانه ۲۴۵ تن انواع گیاهان دارویی در کشورمان تولید می‌شود و در واقع ایران مهد گیاهان دارویی نادر به شمار می‌رود، در حالی که هنوز بانک ژن جامع گیاهان دارویی تشکیل نشده است. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمانهای گیاهی و به طور کلی فرآورده های طبیعی به ویژه در طی سالهای اخیر رو به افزایش بوده و مهمترین علل آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگیهای زیست محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند از سوی دیگر است. مواد مؤثره گیاهان دارویی شامل ترکیبات پیچیده شیمیایی هستند که در اندام‌های مختلف گیاهان دارویی تولید و ذخیره می‌شوند.

این مواد به دو دسته تقسیم می‌شوند: اول مواد حاصل از سوخت و ساز اوّلیه (اساساً ساکارید)

یا مواد مورد نیاز و حیاتی، که در همهٔ گیاهان سبز با عمل فتوسنتز به وجود می‌آیند. نوع دوم مواد حاصل از سوخت و ساز ثانویه که در اثر جذب ازت توسط گیاه تولید می‌شوند. گلوکوزیدها از سوخت و ساز ثانویهٔ گیاهان به دست می‌آیند. ساپونین‌ها در بسیاری از گیاهان دارویی وجود داشته و از نظر علم شیمی به وسیلهٔ ریشهٔ گلوزیدیک (گلوکز، گالاکتوز) که متصل به ریشهٔ آگلیکون است، مشخص می‌شوند. خاصیت اصلی فیزیکی آن‌ها کاهش شدید فشار سطحی آب است. تمام ساپونین‌ها کف زیادی دارند و از پاک کننده‌های عالی هستند. اثرات کارکردی و سلامت‌بخشی پلی‌ساکاریدها که از جمله ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان دارویی هستند به اثبات رسیده است، بطوریکه امروزه استفاده از پلی‌ساکاریدها در صنایع مواد غذایی برای بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محصولات تولیدی امری اجتناب ناپذیر گردیده است. لذا معرفی منابع جدیدی از گیاهان داروئی که حاوی پلی‌ساکاریدهای قابل کاربرد در صنعت باشند بسیار ارزشمند است. گیاه سریش گیاهی داروئی است که از قسمت‌های مختلف آن به صورت سنتی و صنعتی در کشور ما استفاده بسیار شده است اما با این وجود مطالعات جامعی در ارتباط با شناسایی ترکیبات و مواد طبیعی موجود در آن صورت نگرفته است، لذا در این پژوهش سعی گردیده است تا حدی این خلل جبران شده و پلی‌ساکاریدهای موجود در ریشه گونهٔ تماشایی بختیاری آن، که از مهمترین گونه‌های این جنس می‌باشد، به صورت جامع بررسی شود.

۱- تعریف قندها

کربوهیدرات‌ها فراوان‌ترین پلی‌مرهای زیستی روی زمین هستند که در ارگانیسم‌های زنده یافت می شوند (Dumitriu, S.2004). این ترکیبات اجزای ا صلی مواد غذایی ه ستند، که بیش از ۹۰٪ وزن خشک میوه‌ها و سبزی‌ها را تشکیل می‌دهند. ۷۰-۸۰٪ از کالری بشر در سراسر جهان از کربوهیدرات‌ها دریافت می شود. قندها پلی‌هیدروک سی کربونیل‌هایی ه ستند که به صورت مونو، دی، تری، تترا یا الیگوساکارید (معمولا ۳ تا ۱۰ واحد قندی) در یک یا چند واحد وجود دارند (Song, E, H., Shang, J., & Ratner, D, M. 2012).

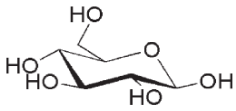
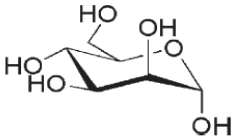
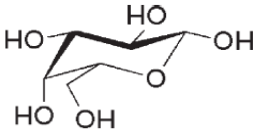
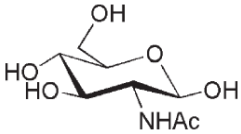
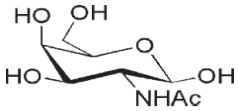
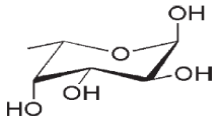
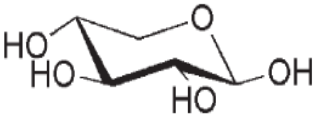
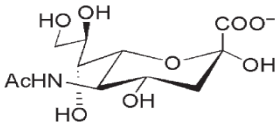
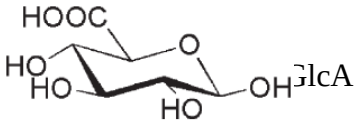
۱-۱- مونوساکارید

مونوساکاریدها واحدهای ساختمانی پلی‌ساکاریدها هستند، که در محلول در حالت تعادل بین فرم زنجیره باز و حلقوی وجود دارند. این مواد ترکیبات کووالانسی کربن و آب با نسبت یک به یک $(CH_2O)_n$ می باشند که در آن n برابر ۳، ۴، ۵، ۶ یا ۷ است. هگزوز ها و پنتوز ها مهمترین مونو ساکاریدهای مواد غذایی به شمار رفته و گلوکز و فروکتوز رایج‌ترین آن‌ها ه‌ستند. مونو ساکاریدها به دو گروه آلدوزها و کتوزها دسته‌بندی می‌شوند. همان‌طورکه از نامشان مشخص است، آلدوزها محتوی یک گروه عاملی آلدئیدی در کربن۱(C1) و کتوزها حاوی گروه کربونیل در کربن شماره۲ (C2) هستند. کربن شماره ۱ برای آلدوزها و کربن شماره ۲ برای کتوزها مراکز واکنش‌پذیر و به عنوان اتم‌های کربن آنومری شناخته می‌شوند (Wrolstad, R. E. 2012).

در محیط آبی، مونوساکاریدها عمدتاً در فرم همی‌استال یا حلقوی وجود دارند که این فرم ن سبت به نوع زنجیره باز پایدارتر ا ست. اگر یک آلدوهگزوز پیش ماده همی ا ستال حلقوی با شد، یک پیرانوزید ۶ ضلعی تشکیل می‌شود و اگر یک کتوهگزوز یا آلدوپنتوز پیش‌ساز همی‌استال حلقوی باشد، یک فورانوزید ۵ ضلعی تشکیل می‌شود (Song, E, H., Shang, J., & Ratner, D, M. 2012). گلیکوز یک اصطلاح عمومی برای قندهاست. طبقه‌بندی دیگر قندها بر اساس تعداد اتم‌های کربن در مولکول

می‌باشـــد (مانند پنتوز، هگزوز، هپتوز، تتروز، تریوز) (Wrolstad, R. E. 2012). در جدول ۱-۱ چند مونوساکارید با شکل فضایی و نامگذاری نمادین آنها آمده است.

جدول ۱-۱: نام‌های مخفف و نمادین چند مونوساکارید (Song, E, H., Shang, J., & Ratner, D, M. 2012)

نام	مخفف	ساختار	نماد
گلوکز	Glc		
مانوز	Man		
گالاکتوز	Gal		
N-استیل گلوکز آمین	GlcNAc		
N-استیل گالاکتوزآمین	GalNAc		
فروکتوز	Fuc		
زایلوز	Xyl		
اسید سیالیک	SA		
اسیدگلوکورونیک	GlcA		

۱-۲- پلی‌ساکارید

پلی‌ساکاریدها پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند که در اثر هیدرولیز، بیش از ۱۰ واحد قندی آزاد می‌کنند. این پلیمرها براساس مونومرهای تشکیل‌دهنده (همو و هتروپلی‌ساکارید)، ساختار، اندازه یا وزن مولکولی و ویژگی های ایجاد کننده در مواد غذایی تقسیم‌بندی می‌شوند. درجه پلیمریزاسیون پلی‌ساکاریدها که توسط تعدادی از واحدهای مونوساکارید در یک زنجیره تعیین می‌شود، از صد تا چند صد هزار متفاوت است. تنها تعداد کمی از پلی ساکاریدها درجه پلیمریزاسیون کمتر از صد دارند. مسیرهای عمومی بیو سنتز بسیاری از پلی ساکاریدها شناخته شده هستند، اما مکانیسم‌های کنترل رویدادهای خاص بیوسنتز، مانند دانسیته و توزیع شاخه در طول زنجیره پلی‌ساکارید به طور کامل مشخص نیست (Cui, S. W. 2005).

۱-۳- نامگذاری قندها

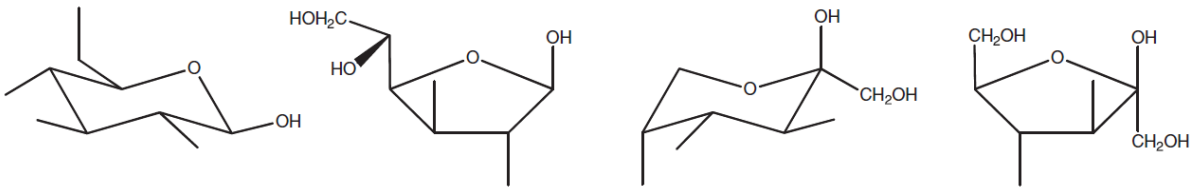
قندها یک نام رایج با منشاء تاریخی از شیمی، پزشکی و صنعت دارند. یک روش سیستماتیک برای نامگذاری قندها (برخی نمونه‌ها در جدول ۱-۲ نشان داده شده است) نیز وجود دارد. گلوکز عموماً با نام دکستروز شناخته می‌شود. در نامگذاری سیستماتیک پسوند هگزوز نشان‌دهنده یک قند آلدوز ۶ کربنه است و پیشوند گلوکو[۱] جهت‌گیری گروه‌های هیدروکسیل اطراف کربن‌های ۲ تا ۵ را نشان می‌دهد و نماد D به جهت‌گیری گروه‌های هیدروکسیل در کربن شماره ۵ اشاره دارد که به عنوان اتم کربن مرجع شناخته شده‌اند. قندهای هگزوز و پنتوز به فرم‌های حلقوی وجود دارند و تنها تعداد اندکی به فرم غیر مدور (مارپیچ) هستند. بنابراین پیش‌بینی‌های فیشر به هیچ وجه بیانگر فرم ساختاری واقعی نیستند. قندها به دو فرم ساختار حلقوی ۶ ضلعی (پیرانوز) و ۵ ضلعی (فورانوز) وجود دارند (شکل ۱-۱).

۱ - Gluco

حلقه فورانوز نسبتاً مسطح است، درحالی‌که حلقه پیرانوز چین‌دار[1] و در اشکال قایق و صندلی است (Wrolstad, R. E. 2012).

جدول ۱-۲: نامگذاری رایج، ساختار و منابع برخی از قندها (Dumitriu, S. 2004)

نوع اتصال	نام عمومی	ساختار	منبع
اتصال (۴←۱)	مالتوز	Glc*p*α 1 → 4 Glc	نشاسته
	سلوبیوز	Glc*p*β 1 → 4 Glc	سلولز
	لاکتوز	Glc*p*β 1 → 4 Glc	شیر پستانداران
	زایلوبیوز	Xylβ 1 → 4 Xyl	زایلان
اتصال (۶←۱)	ایزومالتوز	Glc*p*α 1→ 6 Glc	آمیلوپکتین
	ژنتیوبیوز	Glc*p*β 1→ 6 Glc	ژنتیانوز
	ملی‌بیوز	Gal*p*α 1→ 6 Glc	رافینوز
اتصال (۳←۱)	نیجروز	Glc*p*α 1→ 3 Glc	موتان
	لامیناریبیوز	Glc*p*β 1 → 3 Glc	لامیناران
	تورانوز	Glc*p*α 1 → 3 Fru*f*	ملِزیوز *(عسل)*
	اسید هیالوبیورونیک	GlcUA*p*β 1 → 3 GlcN	اسید هیالورونیک
اتصال (۲←۱)	کونجیبیوز	Glc*p*α 1 → 2 Glc	آسپرژیلوس اورایزه
	سوفوروز	Glc*p*β 1 → 2 Glc	سوفورا ژاپونیکا
	ساکارز	Fru*f*β 1 → 2 αGlc*p*	چغندر قند
اتصال (۱←۱)	α-α- تره هالوز	Glc*p*α 1 → 1 αGlc*p*	مخمر



β-D-فروکتوفورانوز　　β-D-فروکتوپیرانوز　　β-D-گلوکوفورانوز　　β-D-گلوکوپیرانوز

شکل ۱-۱: ساختار پیرانوز و فورانوز β-D- گلوکز و β-D- فروکتوز

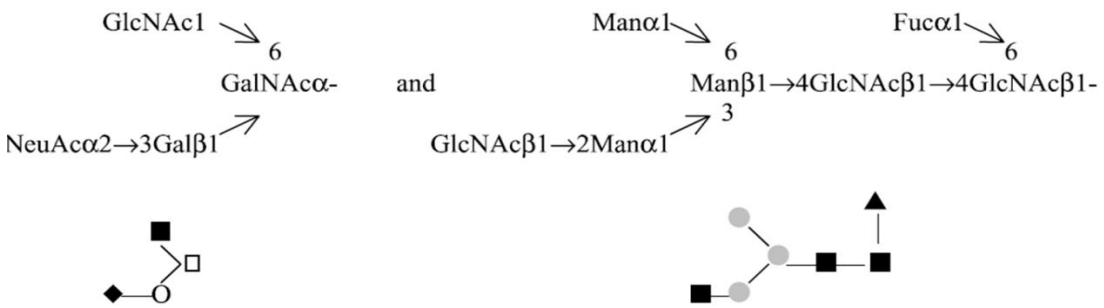
۲ - Puckered

در نامگذاری نمادی، همانند شکل ۱-۲ از چند قانون تبعیت می‌شود:

- هر نوع قند (به‌عنوان مثال قندهایی با جرم یکسان) باید شکل یکسان داشته باشد.
- ایزومرهای هرنوع قند مانند گلوکز، مانوز، گالاکتوز باید توسط رنگ یا سایه سفید/ سیاه/ سفید و سیاه از هم متمایز شوند.
- سایه یا رنگ یکسان برای مشتقات هگزوزها استفاده شود.
- برای نمایش قندهای متفاوت، استفاده از شکل یکسان با جهت‌گیری متفاوت باید اجتناب شود.

بر این اساس، نامگذاری نماد (نوع سفید و سیاه)؛ برای هگزوزها (دایره) و N-استیل‌هگزوآمین (مربع)، گالاکتوز (سفید)، گلوکز (سیاه)، مانوز (خاکستری)، فوکوز (مثلث)، زایلوز (ستاره) و سیالیک اسید (لوزی) است (Tsai, C. S. 2007).

قند	نامگذاری نماد	
گالاکتوز (سفید)	○	□
گلوکز (سیاه)	●	■
مانوز (خاکستری)	●	■
فوکوز (مثلث)	▲	
زایلوز (ستاره)	☆	
اسید سیالیک (لوزی)	◆	



شکل ۱-۲: نامگذاری نمادین برای هگزوزها و N-استیل هگزوآمین

۱-۴- طبقه‌بندی پلی‌ساکاریدها

با توجه به تنوع زیاد در بین پلی‌ساکاریدها، آن‌ها را می‌توان از جهات مختلفی طبقه‌بندی کرد، ازجمله:

- ساختار شیمیایی پلی‌ساکاریدها: برخی از پلی‌ساکاریدها ساختار خطی و برخی ساختار منشعب دارند. بر این اساس انحلال‌پذیری آن‌ها تحت تاثیر قرار گرفته و به صورت کاملا محلول یا به طور جزئی محلول طبقه‌بندی می‌شوند.

- واحدهای تشکیل دهنده: برخی یک نوع مونوساکارید (همو) و برخی بیش از یک نوع مونوساکارید، با گروه‌های استر، اتر یا گروه‌های استال حلقوی دارند.

- بار یونی: برخی از صمغ‌های غذایی خنثی و برخی باردار هستند.

- منابع استخراجی پلی‌ساکارید: صمغ‌های پلی‌ساکارید غذایی از منابع گیاهی دریایی، خشکی و یا توسط میکروارگانیسم‌ها بدست آمده‌اند. همچنین اصلاح شیمیایی سلولز و پکتین، منابع دیگری از هیدروکلوئیدها، با بهبود عملکرد، ایجاد می‌کنند (Wrolstad, R. E. 2012).

در تقسیم‌بندی پلی‌ساکاریدها بر اساس منابع آن‌ها، ۴ دسته پلی‌ساکارید وجود دارد:

- پلی‌ساکاریدهای گیاهی که شامل سلولز و مشتقات آن، همی‌سلولز، پکتین، صمغ‌های ترشحی موسیلاژ، فروکتان و صمغ‌های دانه‌ای هستند.
- پلی‌ساکاریدهای گیاهان دریایی (جلبک‌ها)، مانند آلژینات‌ها، کاراگینان و آگار
- پلی‌ساکاریدهای میکروبی، مانند صمغ زانتان، پولولان و ژلان
- پلی‌ساکاریدهای جانوری، مانند کیتین و کیتوزان‌ها (Dumitriu, S. 2004. Eliasson, A. C. 2006).

۱-۵- کاربرد پلی‌ساکاریدها

قندها کاربردهای متنوعی دارند. پلی‌ساکاریدها علاوه بر خصوصیات شیمیایی، تغذیه‌ای و بیولوژیکی، خصوصیات فیزیکی، مزه و طعم کاربردهای غذایی گسترده‌ای دارند. از این خواص می‌توان جهت پیش‌بینی تاثیر آن‌ها بر روی سیستم‌های غذایی و انتخاب شیوه مناسب اندازه‌گیری اثرات آن‌ها استفاده کرد (Wrolstad, R. E. 2012). پلی ساکاریدها مواد تشکیل دهنده مهم بسیاری از محصولات غذایی هستند. پلی‌ساکاریدهای غذایی شامل نشاسته و مشتقات آن، همراه با تعداد زیادی مواد غیرنشاسته‌ای موسوم به NSPS[1] است. واژه هیدروکلوئید اغلب شامل هر دو گروه می‌شود. پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در صنایع غذایی به عنوان قوام دهنده، نگهدارنده، تثبیت کننده (استابیلایزر[2])، امولسیفایر و عوامل ژل‌کنندگی و تعلیق‌کنندگی به‌کارگرفته می‌شود.

ویژگی‌های ذکر شده، از خواص مولکولی پلی‌ساکاریدها و تعامل آنها با ذرات امولسیون‌ها و دیگر اجزا در سیستم‌های غذایی نشأت می‌گیرد. این ترکیبات می‌توانند در شکل طبیعی خود استفاده شوند، اما در بسیاری از موارد عملکردی، توسط تغییرات شیمیایی اصلاح می شوند (برای مثال در بهبود حلالیت و ظرفیت اتصال آب). چربی به دلیل طعم و عطر، بافت و خواص امولسیونی یک فاکتور مهم است، اما بیشتر مصرف‌کنندگان خواهان محصولات کم‌چرب باخواص حسی مشابه هستند، از این رو جایگزین‌های چربی شامل نشاسته و سایر مواد پلی‌مری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده‌اند (Stephen, A. M., & Phillips, G. O. 2006 Dumitriu, S. 2004,). پیچیدگی در ساختار مولکولی صمغ‌های گیاهی و باکتریایی به مراتب بیشتر است، بطوریکه زنجیره‌های اصلی یکسان و زنجیره‌های جانبی متفاوت هستند. تشخیص میزان نظم ساختاری در صمغ‌های گیاهی سخت‌تر است.

---

۱ - Non starch polysaccharides

۲ - Stabilizer

پلی‌ساکاریدهای گیاهی مثل گالاکتومانان‌ها و گلوکومانان‌ها محلول‌هایی با ویسکوزیته قابل توجه ایجاد می‌کنند، بنابراین این ترکیبات به عنوان امولسیفایر عمل کرده و به طور موثر با پلی‌ساکاریدهای دیگردر تشکیل ژل تعامل ایجاد می‌کنند (Stephen, A. M., & Phillips, G. O. 2006).

۱-۶- استخراج پلی‌ساکاریدها

شناسایی درست و تعیین خصوصیات پلیمرهای کربوهیدراتی در ابتدا نیازمندجدا سازی و خالص سازی پلیمر مورد نظر از منبع اصلی آن است. ماهیت پلی ساکاریدها به ویژه ترکیب شیمیایی، ساختار مولکولی و وزن مولکولی، بر حلالیت آنها تاثیر می‌گذارد.

۱-۶-۱- عوامل موثر بر استخراج و حلالیت پلی‌ساکاریدها

برخی از ویژگی‌های ساختاری موثر در استخراج و حلالیت پلی‌ساکارید در آب در زیر آمده است.

- انشعاب (شاخه): حضور انشعاب در زنجیره پلیمری ارتباط بین مولکولی را مختل و حلالیت پلیمر را افزایش می‌دهد. برای مثال، گالاکتومانان‌های صمغ گوار، به دلیل انشعاب بیشتر، نسبت به گالاکتومانان-های لوبیای خرنوب حلالیت بیشتری دارند. همچنین، پلیمرهای آمیلوپکتین و گلیکوژن به دلیل انشعابات فراوان محلول‌تر و باثبات‌تر از زنجیره‌های آمیلوز خطی هستند.

- گروه‌های یونی: حضور گروه‌های کربوکسیل (COO^-) یا سولفات (SO_4^{2-}) در زنجیره پلی‌مری حلالیت را افزایش داده و از طریق دافعه الکتروستاتیک، مانع ارتباط بین مولکولی می‌شوند. به طورکلی پلی-ساکاریدهای آنیونی محلول‌تر از انواع خنثی هستند.

- پیوند گلیکوزیدی: اتصال (۴→۱)، یک ساختار بسیار متقارن ایجاد می‌کند و ارتباط بین مولکولی را میان واحدهای زنجیره‌های مختلف تسهیل می‌کند. اتصال (۳→۱) تقارن کمتری ایجاد می‌کند و حلالیت پلیمرهای کربوهیدراتی را افزایش می‌دهد؛ برای مثال، سلولز متشکل از گلوکز با پیوندهای β(۱→۴)

کاملا نامحلول در آب است، در حالی که بتا-گلوکان حاوی گلوکز با اتصالات β(۱→۴) و β(۱→۳)، تا حدودی محلول در آب هستند. پیوند (۱→۶) به طور چشمگیری حلالیت زنجیره‌های کربوهیدرات را در آب افزایش می‌دهد، برای مثال، دکستران‌ها و پولولان‌ها به راحتی در آب محلولند. موقعیت α اتصال گلیکوزیدی، حلالیت کل را تغییر نمی‌دهد ولی در مقایسه با موقعیت β باعث افزایش حلالیت می‌شود، برای مثال آمیلوز با پیوندهای گلوکز α(۱→۴) محلول است در حالیکه سلولز با پیوندهای گلوکز (β(۱→۴ نا محلول است.

- غیریکنواختی در تکرار ساختار: هتروپلی‌ساکاریدها که از دو یا چند نوع واحد مونوساکاریدی و اتصال از طریق پیوندهای متفاوت تشکیل شده‌اند، با توجه به پیکربندی و یا موقعیت اتصالشان، عموماً محلول‌تر از هموپلی‌ساکاریدها با اتصالات یکسان هستند.

واکنش‌های کووالانسی و غیر کووالانسی کربوهیدرات‌ها با دیگر اجزای بافت که از آن‌ها استخراج می شوند، به طور قابل توجهی استخراج و حلالیت آنها را در محلول‌های آبی تحت تاثیر قرار می‌دهد. پلی ساکاریدهای گیاهی دارای پیوند کووالانسی (از طریق اتصال دیفرولیک اسید[1]، پیوندهای فنولیک اسید- تیروزین یا فنولیک اسید – سیستئین، اتصالات گلیکوزیدی، اتر و استر) با ترکیبات گیاهی مانند لیگنین، پروتئین و سلولز هستند. این گونه از پیوندهای کووالانسی سبب افزایش نامحلولی در آب می‌شوند و در نتیجه باید حلالی به جز آب برای استخراج مورد استفاده قرار گیرد. همچنین واکنش‌های کووالانسی از طریق پیوندهای یونی (مانند گروههای COO^-رامنوگالاکتورونان‌ها[2] با مواد معدنی یا پروتئین‌ها)، یا نیروهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنیِ کربوهیدرات با یکدیگر یا با اجزای دیگر بافت، استخراج و انحلال‌پذیری آنها را کاهش می‌دهد (Cui, S. W. 2005).

۱-۶-۲- روش‌های استخراج پلی‌ساکاریدها

به طور کلی، پلی‌ساکاریدهای ذخیره‌ای، صمغ‌های ترشحی و پلی‌ساکاریدهای باکتریایی نسبت

---

۱ - Diferulic acid

۲ - Rhamnogalacturonans

به پلی ساکاریدهای ساختاری دیواره سلولی گیاهان و میکروارگانیسم‌ها راحت‌تر ا ستخراج می شوند. برای مثال، صمغ زانتان تولید شده توسط زانتوموناس کامپستریس[1] به طور مستقیم در محیط کشت آزاد می‌شود و به راحتی توسط رسوب با اتانول از محیط کشت مایع جدا می‌شود در حالی‌که پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باید از اجزای نامحلول دیواره استخراج شوند.

در فرآیند استخراج، بسته به عوامل مختلف از جمله شرایط استخراج، نوع پلی‌ساکارید استخراج شده و ترکیب نمونه، حلال‌های مختلفی استفاده می‌شود. حذف چربی از نمونه قبل از استخراج لازم است، زیرا چربی نفوذ آب را محدود می‌کند و روی بازده استخراج تاثیر منفی می‌گذارد. چربی‌ها معمولا با حلال‌های قطبی از جمله محلول‌های کلروفرم- متانول، اتانول (۹۵٪) یا دی‌اکسان و هگزان حذف می‌شوند. برای استخراج ترکیباتی غیرضروری مثل قندهایی با وزن مولکولی کم، مواد معدنی، رنگدانه‌ها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهایی با وزن مولکولی کم، نمونه با اتانول داغ ۸۰٪ تیمار می‌شود. در این شرایط آنزیم‌های موجود در نمونه نیز واسرشت می‌شوند (Stephen, A. M., & Phillips, G. O. 2006., Cui, S. W. 2005).

ترکیبات دیواره سلولی می‌تواند توسط بسیاری از حلال‌ها ا ستخراج شوند، اما معمولا آب در دماهای مختلف اولین انتخاب برای استخراج پلی‌ساکاریدهای خنثی است. معمولاً قابلیت استخراج پلی‌ساکاریدها با افزایش دمای حلال آبی، افزایش می‌یابد. پلی‌ساکاریدهای اسیدی مانند پکتین‌ها، توسط کمپلکس یون‌های فلزی دو ظرفیتی با عوامل شلاته کننده مانند اگزالات آمونیوم، سدیم هگزا متافسفات، EDTA[2] یا CDTA حل می‌شوند.

حلال‌های قطبی غیر آبی مانند دی‌متیل سولفواکسید (DMSO[3]) به حل کردن گرانول‌های نشاسته کمک می‌کنند. N-متیل‌مورفولین-N-اکسید، یک حلال مناسب برای پلی‌ساکاریدهای دیواره

---

۱ - *Xantomonase Campestrise*

۲ - Ethylene diamine tetra acetic acid

- Dimethyle sulfoxide

سلولی مانند سلولز است. معمولا محلول‌های اسیدی، به دلیل احتمال هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی برای استخراج پلی‌ساکاریدها استفاده نمی‌شوند. با این حال، فرآورده‌های تجاری پکتین از پوست مرکبات و یا پالپ سیب، توسط استخراج با محلول‌های آبیِ اسیدی با pH ۱ تا ۳ در دمای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمده‌اند. محلول‌های قلیایی به طور گسترده برای استخراج پلی ساکاریدهای دیواره سلولی استفاده می شوند، اما در مورد نمونه‌های چوبی با نسبت بالای لیگنین؛ قبل از استخراج قلیایی، یک مرحله چوب‌زدایی باید انجام شود که معمولا توسط یک محلول سدیم کلرید- استیک اسید در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود.

معمولا برای کاهش خطر حذف β (حذف مونوساکاریدها از انتهایی احیاکننده زنجیره پلی‌ساکارید) که ممکن است در pH بالا رخ دهد، بروهیدرات سدیم به محلول استخراجی اضافه می شود. تصور می شود که تحت شرایط قلیایی، استر، اتصالات کووالانسی و غیر کووالانسی دیگر شکسته می شوند. همچنین در ابتدا پلی ساکاریدهای غیر قابل استخراج از شبکه دیواره سلولی آزاد می شوند. هیدروکسید باریم اشباع شده به طور خاص، برای استخراج آرابینو زایلان‌های نامحلول در آب از گندم و جو شناخته شده است، در حالی که محلول‌های رقیق شده هیدروکسید سدیم، برای استخراج زایلوگلوکان‌ها، زایلان‌ها، بتاگلوکان‌ها و پکتین‌ها استفاده شده‌اند. باید به این نکته اشاره کرد که وقتی پلی‌ساکاریدها از دیواره سلولی توسط استخراج با قلیا آزاد شدند، در آب محلول می‌شوند.

۱-۷- خالص‌سازی پلی‌ساکارید

روش‌های استخراجی بیان شده، منجر به تولید محلول‌های حاوی مخلوطی از اجزا می‌شود (سایر پلی ساکاریدها، به عنوان مواد غیرکربوهیدراتی) که باید برای جدا سازی پلی ساکارید مورد نظر خالص‌سازی شود (Cui, S. W. 2005). در برخی موارد، مرحله استخراج خود می‌تواند یک مرحله از خالص سازی باشد که در طول مرحله استخراج و یا بعد از این مرحله حاصل می شود. برای مثال در حین استخراج قلیایی، به دلیل تفاوت حلالیت در پلی‌ساکاریدها، این ترکیبات می‌توانند به طور

انتخابی توسط غلظت‌های مختلف قلیا استخراج شوند؛ به‌گونه‌ای که فراکشن‌ها به‌خوبی جدا شوند.

عصاره استخراج شده از گیاهان حاوی ترکیبات ناخالصی است که برای شناسایی دقیق‌تر پلی‌ساکارید موجود در آن، باید حذف شوند. از جمله این ناخالصی‌ها، پروتئین‌ها هستند. روش‌های مختلفی برای حذف ترکیبات پروتئینی مورد استفاده قرار گرفته است که عبارتند از :

- روش‌های شیمیایی:

پروتئین‌ها می‌توانند توسط رسوب با اسید تری‌کلرواستیک (TCA[1]) یا اسید سولفوسالیسیلیک حذف شوند، اما احتمال هم‌رسوبی[2] برخی از صمغ‌ها مانند آلژینات‌ها یا پکتین‌هایی با متوکسیل پایین، نیز وجود دارد. همچنین از کلروفرم و ۱-بوتانول (روش سواگ[3]) و یا تری‌فلوروتری‌کلرواتان نیز برای خالص‌سازی استفاده می‌شود (Stephen, A. M., & Phillips, G. O. 2006., Cui, S. W. 2005).

- روش‌های فیزیکی

جذب غیراختصاصی پروتئین‌ها روی سلیت[4]، خاک دیاتومه و رس‌های مختلف از روش‌های فیزیکی مورد استفاده برای پروتئین‌زدایی از عصاره گیاهان است. حذف پروتئین‌ها همچنین می‌تواند توسط عبور محلول حاوی پروتئین از رزین تبادل کاتیونی قوی به شکل H^+ انجام شود. زیرا از بین پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای خنثی یا آنیونی، تنها پروتئین‌ها بار مثبت دارند، در نتیجه به ستون متصل شده در حالی‌که پلی‌ساکاریدها کاملا عبور می‌کنند (Cui, S. W. 2005).

- روش‌های آنزیمی

پروتئین‌ها توسط هضم با آنزیم‌های پروتئولیتیک، پاپایین یا پروتئازهای باکتریایی حذف می شوند. البته باید اطمینان حاصل شود که آنزیم‌های مورد استفاده فاقد گلیکوهیدرولازهای تجزیه

---

۱ - Trichloroacetic acid

۲ - Co-precipitating

۳ - Sevag

۱ - Celite

کننده زنجیره پلی‌ساکارید هستند.

روش‌های مختلفی برای تایید میزان خلوص پلی ساکاریدها وجود دارد. در اغلب موارد، حضور و مقدار نیتروژن، میزان ناخالصی به پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. این روش برای پلی‌ساکاریدهایی مانند β- گلوکان‌ها، آرابینوزایلان‌ها، سلولز، صمغ‌های زانتان، ژلان، کاراگینان و آلژینات که باید حاوی حداقل مقدار ناخالصی پروتئینی باشند، قابل اجراست ولی برای پلی‌ساکاریدهایی مانند صمغ عربی یا آرابینوگالاکتان‌ها که حاوی پپتیدهایی با پیوند کووالانسی قوی هستند، کاربرد ندارد (Wrolstad, R. E. 2012., Cui, S. W. 2005).

در جدا سازی پلی ساکارید غالب مورد نظر، سایر کربوهیدرات‌های موجود در نمونه، ترکیبات ناخالص محسوب شده و باید حذف شوند. حذف سایر کربوهیدرات‌ها به چند روش انجام‌پذیر است:

۱. استفاده از آنزیم:

حذف سایر ناخالصی‌های کربوهیدراتی، توسط هضم با آنزیم‌های هیدرولیتیک مناسب، امکان پذیر است. برای این منظور، باید از آنزیم‌های بسیار خالص و فاقد فعالیت‌های جانبی استفاده شود. برای مثال، α- آمیلاز بزاق یا α-آمیلاز پانکراس خوک، به‌دلیل خلوص و عدم فعالیت جانبی آنزیم، برای هیدرولیز نشاسته استفاده می شود، اما α-آمیلازهای باکتری با سیلوس سوبتیلیس، همراه با β-گلوکاناز هستند؛ لذا نمی‌توان از آن‌ها استفاده کرد. پس از هیدرولیز، قطعات ایجاد شده در محلول بدلیل وزن مولکولی کم، توسط دیالیز حذف می‌شوند (Cui, S. W. 2005).

۲. استفاده از حلال:

جداسازی پلی‌ساکاریدهای مختلف بر اساس تفاوت در حلالیت یا قابلیت رسوب انتخابی امکان‌پذیر است. برای مثال، در عصاره‌های آبی جو، β-گلوکان‌ها از آرابینوزایلان‌ها توسط رسوب جزءبه‌جزء با آمونیوم سولفات جدا می‌شوند. بیشتر پلی‌ساکاریدهای آنیونی نیز می‌توانند با تبدیل شدن به نمک، نامحلول شوند.

۳. روش‌های کروماتوگرافی:

انواع مختلفی از روش‌های کروماتوگرافی برای جداسازی پلی‌ساکاریدها از یکدیگر و یا از ناخالصی‌های غیرکربوهیدراتی وجود دارد. کروماتوگرافی ژل فیلترا سیون برای هر دو نوع پلی ساکارید خنثی و آنیونی مناسب است و جداسازی پلی‌ساکاریدها بر اساس وزن مولکولی و حجم هیدرودینامیکی آن‌ها صورت می‌گیرد. برای مثال، آرابینوزایلان‌ها و آرابینوگالاکتان‌ها توسط کروماتوگرافی ژل‌تراوا با استفاده از ستون‌های سفادکس به طور موثری جدا می‌شوند.

کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل‌سلولز برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای خنثی و اسیدی مناسب است. برای شناسایی پلی‌ساکاریدها و اثبات حضور آن‌ها در محلول‌ها روش‌های مختلفی وجود دارد. از جملهٔ آن‌ها، روش‌های فیزیکی، شیمیایی (رنگ‌سنجی) و کروماتوگرافی را می‌توان نام برد که در ادامه شرح داده می‌شود.

۱) روش‌های فیزیکی

- رفراکتومتری:

ضریب شکست محلول‌های قندی به صورت خطی با غلظت رابطه مستقیم دارد. بنابراین، غلظت قند می‌تواند به راحتی به صورت تابعی از ضریب شکست اندازه‌گیری شود. از آنجا که ضریب شکست محلول‌های قندی برای کالیبراسیون رفراکتومترها استفاده می‌شود، اندازه‌گیری دقیق به محلول‌های ساکارز محدود می‌شود. در عمل، اندازه گیری به طور گسترده برای آب میوه‌ها و سایر نو شیدنی‌ها که حاوی مواد حل شده دیگر مانند ا سیدهای آلی ا ست، ا ستفاده می شود. الکل اثر قابل ملاحظه‌ای روی ضریب شکست دارد؛ از این رو، رفراکتومترها نمی‌توانند برای اندازه‌گیری میزان قند در برخی نوشیدنی‌ها مانند آب‌جو استفاده شوند.

- دانسیته :

یک رابطه خطی بین وزن مخ صوص و غلظت محلول‌های آبی ساکارز وجود دارد. تعیین وزن مخ صوص با پیکنومتر (چگالی سنج) یکی از روش‌های تعیین غلظت قند ا ست. این فرایند تا حدودی خسته کننده است.

- پلاریمتری :

ا ستفاده از پلاریمتر برای اندازه‌گیری غلظت قند به محلول‌های قندی خالص محدود می شود و قابل استفاده برای مخلوطی از قندهای مختلف نیست.

۲) روش‌های رنگ سنجی:

قندها ترکیبات بی‌رنگ اما واکنش‌پذیر هستند. تیمار قندها با اسیدهای مختلف می‌تواند منجر به هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی و آبگیری قند شود. در این شرایط، کمپلکس‌های حاصله با ترکیبات مختلف می‌تواند مواد رنگی تولید کند. تشـــخیص کیفی هگزوزها در مقابل پنتوزها و آلدوزها در مقابل کتوزها امکان پذیر است.

- قند کل توسط فنول- اسید سولفوریک

کمپلکس فنول- ا سید سولفوریک، رو شی قدیمی، بر ا ساس تراکم م شتقات فوران با فنل در تولید ترکیبات رنگی، برای تعیین قندهای احیاءکننده اســت. این روش رنگ ســنجی ســاده، ســریع، دقیق، حساس و قابل اجرا برای مونوساکاریدها، الیگوساکاریدها، پلی‌ساکاریدها و قندهای مشتق شده اســـت. در این روش نمونه‌های آلی، حاوی مقدار کم کربوهیدرات (μg ۱۰۷۰ در ۱ یا ۲ میلی‌گرم) با فنول (۱ میلی‌لیتر از ۵٪ محلول) مخلوط شـده و سـپس در یک جریان مسـتقیم از اسـید سـولفوریک غلیظ (۵ ml) قرار داده می‌شود. پس از گذشت مدت زمان مشخص (۲۰ تا ۲۵ دقیقه)، جذب در ۴۹۰ نانومتر برای هگزوزها و ۴۸۰ نانومتر برای پنتوزها و ا سیدهای اورونیک اندازه‌گیری می شود. کمپلکس حاصل از تجزیه قند با فنول ایجاد رنگ زرد می‌کند. این روش در شرایط ایده‌آل تا ٪۲ دقت دارد.

- روش‌های احیاء قندها

روش لین آینون[1] نوعی از واکنش فهلینگ برای تعیین مقدار قند احیاءکننده توسط تیتراسیون است. این روش در کارخانجات نوشیدنی انگور برای اندازه‌گیری قندهای احیاءکننده کل استفاده می شود. در این روش، یک محلول استاندارد گلوکز تحت شرایط حرارت مشخص با سولفات مس قلیایی وارد واکنش می‌شود. یک میلی‌متر از نمونه مورد آزمایش به نصف محلول گلوکز استاندارد اضافه می شود و مقدار قند مورد نیاز برای احیاء از طریق تیترا سیون (با استفاده ازمتیلن بلو به عنوان شاخص نقطه پایانی) تعیین می‌شود

۳) روش کروماتوگرافی

عصاره گیاهی معمولا حاوی مخلوطی از قندها است. روش کروماتوگرافی فواید حذف مواد مزاحم و حفظ شاخص‌ها، را که برای شناسایی مفیدند، ارائه می‌دهد. روش‌های کروماتوگرافی برای آنالیزهای معمولی سریع، حساس و مناسب هستند.

- کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک (PTL[2]):

از این نوع کروماتوگرافی در سال ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰به طورگسترده برای آنالیز قند استفاده می‌شد. هزینه تجهیزات این روش بسیار کم و حساسیت آن‌ها ۱ میکروگرم است. تعدادی از اسپری‌های آشکارکننده[3] تولید شده‌اند که برخی از آن‌ها می‌توانند قندهای احیاء کننده از غیر احیاءکننده، پنتوزها از هگزوزها و کتوزها از آلدوزها را تشخیص دهند. اگرچه استفاده از آن‌ها در اکثر آزمایشگاه‌ها با HPLC[4] جایگزین شده است، ولی بااین حال هنوز هم یک روش بسیار مفید محسوب می‌شود. برای مثال لو و سوالو[5] در سال ۱۹۹۳ برای شناسایی اولیگوساکاریدهای بسیار ناچیز در شربت

---

۱ - Lane-Eynon

۱ - Paper Thin Layer

۲ - Visualization sprays

۳ - High Performance Liquid Chromathography

۴ - Low & Swallow

اینورت تجاری، کروماتوگرافی کاغذی را همراه با HPLC، کروماتوگرافی گاز- مایع (GLC[1]) و -C_{13}[2] NMR اســتفاده کردند. در تعیین احیاءکننده یا غیر احیاءکننده بودن اولیگوســاکاریدهای جدا شــده، معرف ا سید دی نیترو سالیـسیلیک و برای تعیین وجود کتوز، معرف آنترون[3] با موفقیت ا ستفاده شده است

۱. کروماتوگرافی گازی

قندها فرار نیستند و پیش از آنکه بتوان آن‌ها را با GLC تجزیه نمود، باید مشتق‌سازی شوند. تشـکیل اسـتات‌های آلدیتول روشـی اسـت که به طور گسـترده در جداسـازی و شـناسـایی قندها در پلی‌ساکارید دیواره سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از محدودیت‌های این روش این است که گلوکز، فروکتوز و ســوربیتول، همگی هگزا اســتات D-گلوســیتول تشــکیل می‌دهند و قندهای کتوزی مانند فروکتوز، دو نوع آلدیتول تشکیل می‌دهند.

۱-۸- مرحله ترسیب

پلی‌ســاکاریدهای باقی‌مانده در محلول، پس از مراحل مختلف خالص‌ســازی با الکل یا اســتون رسوب داده می‌شود. با در نظر گرفتن دو عامل غلظت و وزن مولکولی بالا، امکان رسوب پلی‌ساکاریدها با الکل وجود دارد، زیرا پلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی کم و نیز محلول‌های بسیار رقیق، مانع رسوب کامل می‌شــوند. به طور معمول، ترســیب پلی‌ســاکاریدها با افزودن ۳ تا ۴ حجم از الکل (۷۶-۷۱٪) به محلول‌های حاوی پلی‌ساکارید انجام می‌شود (Wrolstad, R. E. 2012).

۵ - Gas-liquid chromathography

۶ - Carbon13- Nuclear magnetic resonance

۱ - Anthrone

۱-۹- تشخیص و شناسایی پلی‌ساکارید

تعیین توالی پلی‌ســـاکاریدها به دلایل ماهیت ناهمگون پلی‌ســـاکارید، وزن مولکولی بالا و پلی‌دیسپرسیتی[۱] زنجیره پلی‌مر، دشوار است. همچنین پلی‌ساکاریدها گروهی بسیار ناهمگن و متغیر از نظر شکل (خطی، شاخه‌دار)، بار یونی (خنثی، آنیونی) و حلالیت هستند به طوریکه حتی در یک نوع از پلی ساکارید نیز تنوع وجود دارد. بنابراین تجزیه و تحلیل ساختار پلی ساکارید نیازمند تکنیک‌های ویژه‌ای است که این تکنیک‌ها با روش‌های مورد استفاده برای مولکول‌های کوچک و پلی‌مرهای زیستی دیگر متفاوت است. برای درک ساختار اولیه یک پلی‌ساکارید اطلاعات زیر ضروری است:

- ترکیب مونوساکاریدی: ماهیت و نسبت مولی مونوساکاریدهای سازنده پلی‌ساکارید
- الگوی اتصال: موقعیت‌های اتصال بین اتصالات گلیکوزیدی و شاخه‌ها
- اندازه حلقه: وجه تمایز حلقه‌های فورانوزی و پیرانوزی
- موقعیت آنومری: موقعیت α یا β اتصال گلیکوزیدی
- توالی مونوساکاریدی و تکرار واحدها
- استخلاف: موقعیت و ماهیت گروه‌های OH؛ به عنوان مثالO-فسفوریلاسیون، استیله شدن و O-سولفوره
- وزن مولکولی و توزیع وزن مولکولی

از آنجاییکه آنالیز ســاختاری پلی‌ســاکارید کار پیچیده‌ای اســت، وجود راهبرد مناســب قبل از شروع هر آزمایش لازم است. یک پلی‌ساکارید استخراج شده از مواد گیاهی یا محصولات غذایی قبل از تجزیه و تحلیل ساختاری، خالص‌سازی می‌شود. گام اول شناسایی یک پلی‌ساکارید، تعیین خلوص آن است که این امر توسط ترکیب شیمیایی شامل درصد قند کل، سطح اسید اورونیک، پروتئین‌ها، خاکستر و رطوبت مشخص می شود. روش‌های رنگ سنجی برای تخمین محتویات کل قندها و اسید

۱ - Polydispersity

اورونیک مناسب است. گام دوم تعیین ترکیب مونوساکاریدها است. برای پی بردن به ساختار پلی ساکاریدها سه روش شیمیایی، طیف سنجی و آنزیمی وجود دارد که در این پژوهش به علت عدم استفاده از روش آنزیمی تنها به بررسی دو مورد اول پرداخته می‌شود.

۱-۹-۱- روش‌های شیمیایی آنالیز پلی‌ساکارید

۱-۹-۱-۱- تعیین الگوی اتصال

۱- آنالیز متیلاسیون

آنالیز متیلاسیون بیش از یک قرن است که برای تعیین ساختار کربوهیدرات‌ها استفاده می‌شود و هنوز هم قدرتمندترین روش در تجزیه و تحلیل ساختار کربوهیدرات‌ها است. آنالیز متیلاسون شامل دو مرحله زیر است:

۱-مشتق‌سازی شیمیایی

۲- کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی (GC-MS[۱])

مشتق‌سازی پلی‌ساکارید شامل تبدیل تمام گروه‌های هیدروکسیل آزاد پلی‌ساکارید به متوکسیل و سپس هیدرولیز اسیدی آن است. این عمل تنها اتصالات درون گلیکوزیدی را جدا می‌کند و پیوندهای متیل-اتر دست نخورده باقی می‌مانند. مونومرهای هیدرولیز شده به محصولات فرّار، احیاء و استیله می‌شوند. با این حال این روش هیچ اطلاعاتی در مورد توالی یا نوع آنومری اتصالات گلیکوزیدی نمی‌دهد، همچنین نمی‌تواند مشخص کند که یک آلدیتول از آلدوپیرانوز با اتصال-O-۴ و یا از آلدو فورانوز با اتصال -O-۵ مربوطه مشتق شده است. این نواقص می‌تواند توسط روشی به نام برش احیاءکننده برطرف شود. به‌طور تجربی، واکنش تبدیل گروه‌های هیدروکسیل به متوکسیل، به یک محیط قلیایی و گروه دهنده متیل نیازمند است. در گذشته از اکسید نقره- یدید متیل و متیل

۱ - Gas Chromathography-Mass Spectroscopy

سولفات سدیم هیدروکسید استفاده می شد که بعدها توسط دیمسیل سدیم[1] و یدید متیل جایگزین شدند. امروزه از پودر خشک هیدروکسید سدیم و یدید متیل استفاده می شود که با استفاده از تعلیق هیدروکسید سدیم در دی‌متیل سولفواکسید (DMSO) اصلاح شده است. شرط لازم برای واکنش متیلاسیون، انحلال کامل پلی ساکارید در DMSO است. برای این منظور، می‌توان با استفاده از شیکر ثابت و یا تیمار با فرا صوت در دماهای بالا (بالاتر از ۷۰ درجه سانتی‌گراد) انحلال‌پذیری کامل را ایجاد کرد، در غیر این صورت متیلاسیون ناقص انجام شده و منجر به نتیجه‌گیری نادرست در مورد ساختار می‌شود. هیدرولیز بعدی پلی‌ساکارید متیله شده، در اسیدهای آلی انجام می‌شود.

از آنجایی که تری‌فلورواستیک‌اسید (TFA[2]) به راحتی توسط تبخیر حذف می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طور معمول، پلی‌مر متیله شده در TFA۰/۴ M در دمای ۱۰۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ تا ۶ ساعت هیدرولیز می‌شود و سپس TFA توسط تبخیر، تحت جریان نیتروژن، حذف می‌شود. نیتروژن به عنوان گاز بی اثر در جلوگیری از واکنش‌های شیمیایی نامطلوب مانند اکسیداسیون مؤثر است. اگر از اسید معدنی به جای TFA استفاده شود، مخلوط هیدرولیز شده باید به pH خنثی برسد.

مونوساکارید حاصل از شرایط قلیایی، توسط تیمار با بورودئوترید سدیم احیاء می‌شود. بورودئوترید سدیم یک اتم دوتریوم روی موقعیت کربن شماره ۱ ایجاد می‌کند و تمایز بین اتم‌های کربن شماره ۱ و ۶ را تسهیل می‌کند. بورودئوترید اضافی با افزودن اسید استیک به اسید بوریک تبدیل شده و از محیط خارج می‌شود (Cui, S. W. 2005). این روش قدیمی و پرکاربرد است، موقعیت اتصالات در پلی‌ساکاریدها را تعیین می‌کند و بر پایه اریتریفیکاسیون[3] کامل گروه‌های هیدروکسیل آزاد است؛ آنهایی که در تشکیل حلقه درگیر نیستند، اتصالات گلیکوزیدی درون قندی، حمل استخلاف‌ها که در شرایط

---

۱ - Dimsyl sodium (sodium methyl sulfiny methanide)

۲ - Trifloroactic acid

۲ - Eritherification

مورد استفاده برای متیلاسیون پلی‌ساکارید و هیدرولیز ثانویه مشتقات متیله شده، پایدار هستند. آنالیز متیلاسیون بیشترین روش مورد استفاده برای تعیین ساختار واحدهای مونوساکاریدی در اولیگوساکاریدها، پلی‌ساکاریدها وگلیکوکونژوگیت‌ها است. همچنین متیلاسیون اطلاعاتی در مورد اندازه حلقه (پیرانوز یا فورانوز)، گروه‌های غیر احیاء کننده انتهایی، واحدهای زنجیره و نقاط منشعب شده در پلی‌ساکاریدها می‌دهد. برای مثال حضور گروه متوکسیل در کربن شماره ۴ و ۵ به ترتیب نشان‌دهنده پیرانوز یا فورانوز بودن حلقه است (Muralikrishna & Rao, M. V. S. S. T. S. 2007).

۲- هیدرولیز جزئی اسیدی

هیدرولیز جزئی پلی ساکاریدها توسط هیدرولیز اسیدی، بر مبنای این واقعیت است که برخی اتصالات گلیکوزیدی نسبت به سایر اتصالات، به اسید حساس‌ترند. برای مثال، حلقه‌های فورانوزی و قندهای دئوکسی به عنوان اتصالات گلیکوزیدی ضعیف در نظر گرفته می شوند و می‌توانند به راحتی توسط اسید هیدرولیز شوند. هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی ۶- دئوکسی هگزوزها تقریبا ۵ برابر سریع تر از هگزوزهای مربوطه است.

اگر پلی‌ساکارید تنها حاوی تعداد محدودی اتصالات گلیکوزیدی حساس به اسید باشد، هیدرولیز جزئی مخلوطی از مونوساکاریدها و اولیگوساکاریدها را ایجاد خواهد کرد. بررسی دقیق خصوصیات این محصولات یا بقایای حاصل از اسکلت پلی‌ساکارید، اطلاعات معنی‌داری درباره ساختار پلی‌ساکارید فراهم خواهد کرد. هیدرولیز اسیدی جزئی (ملایم) اغلب اطلاعات مفیدی در مورد موقعیت‌های اتصال اولیگوساکاریدها به پلی‌ساکارید اولیه را نمایان می‌کند.

- **آنالیز شکستن کاهشی**[1]

یکی از مشکلات عمده آنالیز متیلاسیون، از دست رفتن برخی از اطلاعات ساختاری، مانند موقعیت آنومری در طول تبدیل قندها به آلدیتول‌هاست. همچنین از آنجایی که هر دو واحدهای قندی آلدوپیرانوز و آلدوفورانوز یک نوع آلدیتول ایجاد می‌کنند، عدم تشخیص این دو از هم وجود دارد. آنالیز شکست کاهشی این مشکل را برطرف می‌کند. در این روش، پلی‌ساکارید متیله شده توسط تری‌اتیل سیلیلان (TES)[2] و TMSO[3]، تجزیه می‌شود تا آلدیتول‌های انهیدرو پاره‌ای متیله شده ایجاد کند. این ترکیبات به دلیل حذف اکسیژن از موقعیت آنومریشان، تنها در موقعیت اتصال دوم از حلقه قند استیله می‌شوند.

نتایج حاصل از این روش به‌خوبی با نتایج شکست اتصالات توسط روش هیدرولیزِ مورد استفاده در تجزیه و تحلیل متیلاسیونِ استاندارد، مطابقت دارد. بنابراین شکست کاهشی نه‌تنها برای تأیید اندازه حلقه مونوساکاریدها قابل استفاده است، بلکه به عنوان یک روش جایگزین آنالیز متیلاسیون، برای ارائه اطلاعات مربوط به اتصال واحدهای مونو ساکارید می‌تواند کاربرد داشته باشد (Cui, S. W. 2005).

۳- پراکسیداسیون:

پلی‌ساکاریدهای حاوی گروه‌های هیدروکسیل آزاد، پتانسیل واکنش با معرف‌های اکسیداسیون را دارند. واکنش اکسیداسیون می‌تواند برای نشان دادن اطلاعات ساختاری پلی‌ساکارید استفاده شود. از مهمترین روش‌های اکسیداسیون، اکسیداسیون پریودات و تری‌اکسید کروم است.

---

۱ - Reductive cleavage analyse

۲ - Triethylsilylane

۳ - Trimethylsilyl methanesulfonate

- **اکسیداسیون پریودات:**

شکست اکسیداتیو[1] پلی‌ساکاریدها و خصوصیات محصولات آزاد شده از این واکنش، جزئیاتی در مورد نحوه اتصال، ترتیب استخلاف‌ها و موقعیت آنومری اتصال (α یا β) ارائه می‌دهد. اکسیداسیون پریودات یکی از گ سترده‌ترین روش‌های مورد ا ستفاده برای تعیین اتـ صال و ترتیب ا ستخلاف‌ها ست. محـ صولات آزاد شده تو سط روش‌های مختلفی تعیین می شوند که می‌توان به تیترا سیون، روش‌های ا سپکتروفوتومتری برای تخمین محـ صولات اکـ سید شده، تیترا سیون ا سید- باز در اندازه‌گیری ا سید فورمیک آزاد شده و روش‌های رنگ سنجی برای فرمالدئید ا شاره کرد (Muralikrishna & Rao, M. V. S. S. T. S. 2007).

به طور تجربی، پلی‌ســاکاریدها در محلول رقیقی از پریودات ســدیم در دماهای پایین (حدود ۴°C) اکـ سید می شوند و مقدار ا سید فورمیک تولید شده و پریودات مـ صرف شده در فوا صل زمانی مشخص تعیین می‌شوند. ثبت مقدار ثابت از ا سید فورمیک یا پریودات، در دو اندازه‌گیری متوالی زمان پایان واکنش را نشـــان می‌دهد. برای مثال،β-D-گوکان (۰/۵گرم) با ۰/۰۴ مولار پریودات ســـدیم (۵۰۰ml) در دمای ۵°C به مدت ۱۳۵ ســاعت تیمار می‌شــود. جذب پریودات، ۰/۵۸ مول به ازای هر باقی‌مانده D-گوکان است و بعد از ۹۰ ساعت ثابت می‌شود.

مقدار مشـــخصـــی از اتیلن گلیکول (۰/۹۸ گرم) برای از بین بردن پریودات اضـــافی، افزوده می‌شــود و محلول بعد از ۳۰ دقیقه برای حذف نمک‌های معدنی، در مقابل آب مقطر تجزیه می‌شــود. همچنین اکـ سیدا سیون پریودات می‌تواند برای تخمین زدن نـ سبت باقی‌مانده‌های قندی پایانی به غیر پایانی یک پلی‌ساکارید شاخه‌ای مورد ا ستفاده قرار گیرد. با تعیین کمی پریودات مـصرف شده و ا سید فرمیک تولید شـــده همراه با اطلاعات مربوط به واحدهای قندی باقی‌مانده از واکنش اکســـیداســـیون، ماهیت اتـ صال گلیکوزیدی و دیگر ویژگی‌های ساختاری پلی ساکارید مـ شخص می شود. اکـ سیدا سیون

---

۱ - Oxidative cleavage

پریودات می‌تواند برای تخمین درجه پلیمریزا سیون پلی ساکارید خطی با پیوند (۴→۱) ا ستفاده شود. هر زنجیره پلی‌مر با پیوند (۴→۱) پس از واکنش اکسیداسیون، معادل ۳ واحد اسید فورمیک آزاد می‌کند که یکی از انتهای غیر احیاءکننده و ۲ تا از انتهای احیاءکننده پلی‌ساکارید است.

در رابطه با اکسیداسیون پریودات توجه به دو نکته زیر ضروری است:

۱-در پلی‌ساکاریدهای بسیار شاخه‌دار مانند گلیکوژن و صمغ عربی، اسید فورمیک تولید شده از انتهای احیاءکننده، ناچیز در نظر گرفته می‌شود.

۲- در پلی‌ساکاریدهای حاوی اتصالات (۶→۱) این روش نامعتبر است، زیرا در اکسیداسیون پریودات، این اتصالات نیز اسید فورمیک آزاد می‌کنند.

- **اکسیداسیون با تری اکسید کروم**

همه آلدوپیرانوزیدهای استیله شده در موقعیت β- آنومری می‌توانند به راحتی توسط تری‌اکسیدکروم در اسید استیک، اکسید شوند. در حالی که وجود یک آگلیکون متصل به موقعیت α به کندی اکسید می‌شود. این واکنش می‌تواند برای تشخیص موقعیت آنومری باقی‌مانده قندی، در اولیگوساکاریدها مورد استفاده قرار گیرد.

اگر استیله شدن پلی‌ساکارید کامل نباشد برخی مشکلات ایجاد می‌شود که از آن جمله می‌توان به اکسید شدن باقی‌مانده‌های حاوی گروه‌های هیدروکسیل آزاد با تری‌اکسید کروم، بدون در نظر گرفتن موقعیت آنومری آن‌ها، اشاره کرد. موقعیت آنومری معمولا توسط اکسیداسیون تری‌اکسید کروم تعیین می‌شود و این روش می‌تواند با تکنیک‌های مدرن از جمله بمباران سریع اتم (FAB[۱]) طیف سنج جرمی، برای یافتن اطلاعات ساختاری بیشتر، ترکیب شود (Cui, S. W. 2005).

۱ - Fast Atomic Bombar

تری‌اکسید کروم، پلی‌ساکاریدهای حاوی اتصالات نوع β را بهتر از پلی‌ساکاریدهای حاوی اتصالات نوع α اکسید می‌کند. تفاوت آن‌ها، به سهولتِ تشکیل کتواستر، توسط شکست پل اکسیژنی ترکیبات آنومری β، نسبت داده می‌شود (Muralikrishna & Rao, M. V. S. S. T. S. 2007).

۱-۹-۱-۲- تعیین مونوساکارید سازنده

ترکیب مونوساکاریدها، با هیدرولیز کامل اسیدی و سپس آنالیز آن‌ها توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی گازی (GC) تعیین می‌شود (Cui, S. W. 2005).

۱- کروماتوگرافی HPLC:

کروماتوگرافی با کارایی بالا، محبوب ترین روش برای آنالیز مونوساکاریدهای آزاد شده از هیدرولیز پلی‌ساکاریدهاست. از این روش برای جداسازی و شناسایی کربوهیدرات‌ها به مدت چندین دهه استفاده شده است و نسبت به GC چندین مزیت دارد، که عبارتند از:

- روش سریعی است.
- نمونه قبل از آنالیز به مشتق‌سازی نیاز ندارد.

HPLC قادر به تجزیه و تحلیل مخلوط‌های پیچیده از مونو ساکاریدها و اولیگو ساکاریدها ست. طیف گسترده‌ای از فازهای ساکن، شوینده‌ها و آشکارسازها قادر به آنالیز کربوهیدرات‌ها هستند. سیستم‌های تشخیصی زیادی مانند UV، فلورو سانس و الکترو شیمیایی می‌تواند در تکمیل این روش بکار رود، اما پرکاربردترین آن‌ها ضریب شکست (RI) است. از مزیت بارز ضریب شکست، عمومیت آن جهت کاربردهای مختلف و از معایب این روش نامناسب بودن شیب شستشو (لازم در جداسازی مخلوط‌های مونو- دی و اولیگوساکاریدها) است.

۲- کروماتوگرافی گازی (GC)

کروماتوگرافی گازی، روش انتخابی برای جداسازی و شناسایی کربوهیدرات‌هاست. عامل

بازدارنده در کروماتوگرافی گازی استفاده از ترکیبات قندی مقاوم به حرارت است. از طرفی نمونه مورد آنالیز باید ابتدا مشتق سازی شود و سپس استفاده گردد. در استفاده از این نوع کروماتوگرافی باید از مشتقات قندی کربوهیدرات‌ها استفاده کرد. آلدیتول‌های استات و مشتقات TMS به ترتیب مشتقات مورد استفاده برای پلی‌ساکاریدهای خنثی و اسیدی است. آلدیتول‌های استات توسط زمان‌های بازداریشان نسبت به یک استاندارد داخلی، که معمولا هگزا استات اینوزیتول یا میواینوزیتول است، شناسایی می‌شوند(Stephen, A. M., & Phillips, G. O. 2006).

۱-۹-۲- روش‌های طیف‌سنجی

۱-۹-۲-۱- طیف سنج مادون قرمز (FT-IR)

طیف سنجی مادون قرمز تکنیکی موثر برای آنالیز مواد در آزمایشگاه است که برای سالیان دراز مورد استفاده قرار گرفته است. طیف مادون قرمز نشان دهنده یک اثر انگشت از یک نمونه با پیک جذبی است که با ارتعاشات بین باندهای اتم‌های نمونه مطابقت دارد.

از آنجا که هر ماده یک ترکیب منحصر به فرد از اتم‌ها را دارد، هیچ دو ترکیبی طیف یکسان ایجاد نمی‌کند. بنابراین این روش در شناسایی عملی هر نوع از مواد مفید است. علاوه بر این، اندازه پیک‌ها در طیف نشان‌دهنده مقدار مواد موجود است. در ابتدا ابزار طیف سنج مادون قرمز از نوع پراکنده بودند که فرکانس‌هایی انفرادی از انرژی ساطع شده از منبع را جدا می‌کردند. این عمل با استفاده از یک منشور یا شبکه انجام می‌شد. منشور مادون قرمز، مشابه منشور مرئی عمل می‌کند و نور مرئی را به فرکانس خودش جدا می‌کند. آشکارساز مقدار انرژی موجود در هر فرکانس را که از میان نمونه عبور می‌کند، اندازه‌گیری می‌کند. از مزایای تجزیه و تحلیل طیف سنج مادون قرمز می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- روشی غیر مخرب است: این روش طیف سنجی بر خلاف طیف سنجی جرمی پس از یکبار استفاده قابلیت استفاده مجدد را دارد و نمونه تخریب نمی‌شود.
- دقت اندازه گیری این روش بالاست و نیاز به کالیبراسیون خارجی ندارد.
- سرعت این روش بالاست.
- آنالیز نمونه‌هایی با مقادیر بسیارکم توسط این روش امکان‌پذیر است.
- در هر ثانیه یک اسکن انجام می‌دهد (جمع‌آوری یک اسکن در هر ثانیه)
- حساسیت آن بالاست.
- توان نوری بیشتری دارد.
- از نظر مکانیکی ساده است.

بر اساس دامنه طول موج نوری که به نمونه تابیده می‌شود، سه نوع طیف‌سنج وجود دارد: طیف سنج مادون قرمز دور با محدوده طول موج cm^{-1} (۶۵۰-۲۰۰۰)، طیف سنج متوسط با محدوده طول موجcm^{-1}(۴۰۰۰-۶۵۰) و طیف سنج نزدیک با محدوده طول موج cm^{-1} (۱۴۳۰۰-۴۰۰۰).

هر کدام از سه نوع طیف سنج، ذکر شده برای یک سری از ترکیبات شیمیایی استفاده می‌شود برای مثال برای شناسایی ترکیبات آلی باید از IR متوسط استفاده کنیم. در این روش مرحله آماده‌سازی نمونه جامد، برای آنالیز در دستگاه لازم است و حداقل سه روش معمول برای تهیه یک نمونه جامد وجود دارد: روش اول، مخلوط کردن فیزیکی نمونه کاملا پودر شده با پودر برمید پتا سیم (KBr) و سپس تبدیل این مخلوط به یک قرص نازک است که در دستگاه پرس انجام می شود. دلیل انتخاب KBr این است که در عدد موج cm^{-1} (۴۰۰۰-۶۵۰) هیچ پیکی در نمودار ایجاد نمی‌کند و برای طیف سنجی ترکیبات آلی بسیار مناسب است. روش دوم استفاده از خمیر نوژول است. در این روش نمونه با روغن معدنی خرد شده و تعلیقی از نمونه در روغن معدنی ایجاد می‌شود. تعلیق غلیظ بین صفحات نمکی قرار داده می‌شود و در دستگاه قرار می‌گیرد. از جمله ضعف های این روش پوشانده

شدن طیف های نمونه با طیف های روغن معدنی است.

روش سوم، روش مرسوم حل کردن ترکیب آلی در یک حلال می‌باشد که معمولا از CCl_4 به عنوان حلال استفاده می‌شود. وقتی اشعه مادون قرمز یا IR از نمونه عبور می‌کند، مولکول‌ها می‌توانند نور مادون قرمز از فرکانس‌هایی که مطابق تغییرات انرژی در ارتعاشات مولکولی است را جذب کنند. برخی از گروه‌های عملکردی و یا ساختاری، تعداد موج ارتعاشی منحصر به فردی دارند که از این ویژگی برای شناسایی آن‌ها در نمونه استفاده می شود. برای مثال، ارتعاشات کششی گروه کربونیل همیشه در ناحیه cm^{-1} (۱۶۵۰-۱۷۴۰) ظاهر می شود. علاوه بر این، شدت پیک‌ها در طیف، با غلظت مواد موجود متناسب است (Stephen, A. M., & Phillips, G. O. 2006. Walter, R. H. 1997).

۱-۹-۲-۲- طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR)

طیف سنج رزونانس مغناطیسی هسته‌ای به طور معمول برای مولکول‌های کربوهیدراتی کوچک به‌کار گرفته می‌شود. این روش بر اساس فرکانس‌های رادیویی است که توسط اتم‌های هیدروژن و کربن جذب می‌شوند. این طیف‌سنج در ابتدا روشی برای بررسی ساختار مایعات بود و جذب در آن‌ها به صورت پیک‌های تیز ثبت می‌شد، اما با پیشرفت تکنولوژی، ساختارهای حالت جامد نیز با جزئیات مورد مطالعه قرار گرفتند. گاهی اوقات تفسیر طیف‌های نمونه‌های جامد، به دلیل پهن بودن پیک (گستردگی)، مشکل است. با استفاده از این طیف سنج، ساختار پلی‌ساکارید و ناهمگنی آن مورد مطالعه قرار می‌گیرد (Walter, R. H. 1997). این روش طیف سنجی قدرتمندترین و غیر تهاجمی ترین تکنیک فیزیکو شیمیایی در تعیین ساختار پلی ساکاریدها ست. طیف سنج NMR بر پایه خواص مغناطیسی هسته در اتم‌ها به نام اسپین، است. اکثر هسته‌ها یک اسپین دارند، با این حال تنها تعداد کمی از آن‌ها در مطالعات NMR استفاده می‌شوند، از جمله H^1، F^{19} ، C^{13}، P^{31} وN^{15} است. در آنالیز ساختاری پلی‌ساکاریدها غالبا H^1 و C^{13} استفاده می‌شود.

سیگنال‌های H^1-NMR به‌دلیل فراوانی طبیعی آن‌ها، بسیار حساس‌تر از سیگنال‌های -C^{13}

NMR هستند. در نتیجه سیگنال‌های H^1-NMR برای اهداف کمی[1] در برخی موارد استفاده می‌شوند. با این حال هنگامی که محتوی پلی‌ساکارید کمتر از ٪۲۰ در نمونه باشد، بدست آوردن اطلاعات با کیفیت بالا حتی برای اهداف تأیید نیز بسیار دشوار می‌شود، بنابراین استفاده از تکنولوژی NMR نیازمند جداسازی و خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهاست. طیف NMR در جابجایی‌های شیمیایی[2] نسبت به یک استاندارد داخلی (تترامتیل سیلان، TMS) بیان می شود. مهمترین حلال بدون پروتون در NMR، CCl_4 است، سپس کلروفرم دوتره، متانول دوتره (CD_3OD)، D_2O و در نهایت دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده می‌شود. در طیف پروتون تمام جابجایی‌های حاصل از کربوهیدرات‌ها، شامل مونو ساکاریدها، اولیگو ساکاریدها و پلی ساکاریدها در محدوده ppm ۱ تا ۶ از استاندارد TMS هستند. پروتون‌های آنومری هر مونوساکارید، بسته به نوع α یا β آن‌ها، سیگنال‌های قابل تشخیص ایجاد می‌کنند.

برای مثال، پروتون‌های آنومری α در منطقه ppm ۶-۵ و پروتون‌های آنومری β در منطقه ppm ۵-۴ ظاهر می‌شوند. اگرچه سیگنال ۱۳-کربن NMR ضعیف‌تر از پروتون است، ولی مزایای قابل توجهی نسبت به طیف سنجی H^1-NMR در آنالیز پلی‌ساکاریدها دارد، زیرا جابجایی‌های شیمیایی در C^{13}-NMR در یک طیف گسترده‌ای نمایان می‌شود و بر خلاف طیف پروتون، مشکل هم‌پوشانی نخواهد داشت. در طیف ۱۳-کربن، سیگنال کربن‌های آنومری در محدوده ppm ۱۱۰-۹۰ ظاهر می‌شوند. برای پلی‌ساکاریدهایی با قندهای دی‌اکسیژن، سیگنال‌های CH– در یک میدان بسیار بالاتر (ppm ۲۰-۱۵) ظاهر می شوند. سیگنال‌های کربن‌های کربوکسیل پلی ساکاریدهای حاوی اسیدهای اورونیک، در دامنه میدانی (ppm ۱۸۰-۱۷۰) قرار می‌گیرد.

سیگنال‌های اتم‌های کربن دارای گروه‌های هیدروکسیل اولیه مانند C_6 در پیرانوزها و C_5 در

---

۱ - Quantitative

۲ - Chemical shifts

فورانوزها، در محدوده (ppm ۶۴-۶۰) اســت، در حالیکه اتم‌های کربن با گروه‌های هیدروکســیل ثانویه (C_2، C_3 و C_4 در پیرانوزها و C_2 و C_3 در فورانوزها) در محدوده ppm ۸۵-۶۵ ظاهر می‌شــوند. در تعیین طیف NMR از یک پلی‌ســاکارید ناشــناخته، اولین قدم مقایســه طیف بدســت آمده با مقادیر موجود در مستندات علمی[۱] است. شناسایی بیشتر طیف می‌تواند با استفاده از NMR دوبعدی (2D) و تکنیک‌های دیگر کامل شود. طیف سنجی H^1-NMR برای آنالیز کیفی پلی‌ساکاریدها می‌تواند استفاده شــود. مناطق زیر پیک‌ها با تعداد پروتون‌های موجود در نمونه متناســب هســتند و با اســتفاده از یک استاندارد داخلی مناسب، نتایج بسیار دقیقی حاصل می‌شود. با این حال، هم‌پوشانی شدید سیگنال‌های پروتون، مانع آنالیز کمی پلی‌ســاکاریدها در یک نمونه می‌شــود ولی ســیگنال‌های کربن‌های آنومر در طیف C^{13}-NMR به خوبی از دیگر سیگنال‌های طیف جدا می شود (Stephen, A. M., & Phillips, G. O. 2006).

۱-۱۰- معرفی گیاه مورد مطالعه

۱-۱۰-۱- جایگاه گیاه در جهان

نامگذاری گیاهان بر اساس قوانینی که کنگره جهانی گیاه شناسی وضع نموده است، انجام می‌شود. این قوانین در کد بین‌المللی نامگذاری گیاهان (ICBN)[۲] درج شده است. بر اساس سیستم‌های رده‌بندی، گیاه سریش تماشایی بختیاری، با نام علمی *Eremurus spectabilis M.B.subsp.spectabili* به صورت زیر طبقه‌بندی می‌شود (۱). گونه تماشایی[۳] از شاخه پیدازادان[۴]، زیر شاخه نهاندانگان[۵]، رده

۱ - Literature values

۱ - International Code Of Botanical Nomenclature

۲- Spectabilis

۳ - Spermatophyta

۴ - Angiospermes

تک لپه‌ای[۱] است. راسته و خانواده آن به ترتیب لیلیالس[۲] و لاله[۳] است. جنس آن سریش[۴] است.

- **تیره لاله**

این تیره شامل گیاهانی غالباً علفی، با بن دارای پیاز و یا ریزوم هستند. البته گونه‌های چوبی و یا درختی نیز در این تیره وجود دارند. گل‌ها معمولاً نر ماده و گاهی بندرت تک جنس هستند و در حالت اخیر گیاه معمولا دو پایه است. گلها به طور کلی پنج چرخه‌ای، دارای گلپوش آزاد، یا به هم پیوسته و در تمام حالات قطعات گلپوش رنگین و گلبرگ مانند هستند. پرچم‌ها که ۶ عددند روی نهنج و یا روی گلبرگ‌ها قرار دارند. تخمدان سه خانه، تمکن محوری، میوه کپسول و میان برچه گشاست. پیاز در لیلاسه‌ها از ضخیم شدن میانگره‌های بهم فشرده بخش زیرین ساقه، تشکیل شده است و در این حالت نیام برگ‌ها و همچنین برگ‌های فلسی شکل اطراف آن بر اثر اندوختن مواد غذایی ضخیم شده و پیاز از آن به وجود می‌آید.

در بعضی از جنس‌ها، مانند سوسن پیاز پوشیده از برگ‌های فلسی شکل محتوی مواد اندوخته است. جوانه‌های جانبی موجود در پیاز، هر ساله ساقه‌های هوایی ایجاد می‌کنند. با ایجاد ساقه هوایی، هر ساله اندوخته مقداری از فلس‌های پیاز به وسیله محور هوایی مصرف می‌شود و با از بین رفتن این فلس‌ها، فلس‌های تازه دیگری جای آن‌ها را می‌گیرند که سرشار از مواد غذایی هستند و بر اثر فعالیت فتوسنتزی برگ‌های سبز تازه ایجاد می‌شوند. بنابراین در این گیاهان هر ساله مقداری از این پیاز از بین می‌رود و دوباره ترمیم می‌شود.

- **جنس سریش**

گلپوش آنها قیفی شکل، لوله‌ای-استکانی و یا چرخه‌ای، دارای قطعاتی در قاعده کم و بیش به

---

۵ - Monocotyledones
۶ - Liliales
۷ - Liliaceae
۸ - Eremurus

هم متصل‌اند. پرچم‌ها تماماً همانند، غالباً کمانی‌اند و در نزدیک قاعده به پشت بساک می‌چسبند. این جنس در نقاط مختلف ایران دارای ۷ گونه است که در ارتفاعات البرز، شمال شرقی، غرب، بخش مرکزی و نواحی جنوبی می‌رویند (قهرمان، ا. ۱۳۷۳).

- **گونه تماشایی**

این گیاه پایا، دارای ریشه‌های فیبری و ضخیم، استوانه‌ای، گوشتی و بسیار طویل است (شکل ۱-۳). ظهور گیاه عموماً اواخر فروردین انجام شده، گل‌ها اواخر اردیبهشت و خرداد ظاهر و بلافاصله بذر تشکیل می‌شود. زمان بهره‌برداری از گیاهان سریش از نیمه دوم خرداد شروع و تا دو ماه ادامه داد (Brickell, 1996؛ Brayan، 1989؛ Crockett، 1972). پراکندگی جغرافیایی آن به طور عمده در جنوب آسیا از ترکیه و فلسطین تا حداکثر آسیای میانه، شامل کشورهای ترکیه، فلسطین، لبنان، سوریه، عراق، غرب پاکستان، افغانستان، ایران و قفقاز می‌باشد. در ایران نیز در مناطقی مانند خراسان، مریوان، دماوند، خمین، اراک، دشت کرج، کرمانشاه و اطراف چهارمحال و بختیاری قابل رویش است (دشتی و همکاران، ۱۳۸۴).

گیاه سریش از جمله گیاهانی است که از قدیم الایام در امور صنعتی و مصارف خوراکی استفاده می‌شده است. از دانه‌های این گیاه، روغنی گرفته می‌شود که در بعضی از تصلب‌های شریانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از برگ‌های این گیاه به عنوان سبزی خوراکی و از ریشه‌های این گیاه که به صورت غدد پنجه‌ای است به عنوان چسب استفاده می‌شود. ریشه این گیاه گرم و خشک است و برای یرقان، ناراحتی‌های کبدی، خشونت حلق و ناراحتی‌های معده از آن استفاده می‌کنند. از ریشه این گیاه جوشانده‌ای تهیه می‌کنند که برای درمان جوش‌ها بسیار مفید است، زیرا خاصیت ضدعفونی کننده دارد. همچنین باعث تسریع در جوش خوردن استخوان‌های شکسته می‌شود (Rubin, 2002, حاجبی،۱۳۵۵). شمایی از گیاه سریش تماشایی بختیاری در شکل ۱-۴ آورده شده است.

شکل ۱-۳: ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری

شکل ۱-۴ تصویر شماتیک گیاه سریش تماشایی بختیاری

۱-۱۰-۲-موارد استعمال سریش به طریق سنتی

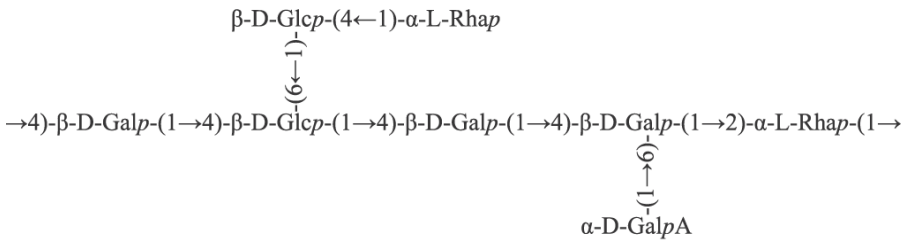
کاربرد این گیاه بیشتر به دلیل چسبنده بودنش است. البته این گیاه علاوه بر این، کاربرد درمانی هم دارد. از دانه های این گیاه، روغنی گرفته می‌شود که در بعضی موارد جهت درمان تصلب‌های شریانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از برگ‌های این گیاه به عنوان سبزی خوردنی و از ریشه‌های این گیاه که به صورت غدد پنجه‌ای است به عنوان چسب استفاده می‌شود. ریشه این گیاه گرم و خشک است و برای یرقان، بیماری‌های کبدی، خشونت حلق و بیماری‌های معده از آن استفاده می‌کنند، ریشه این گیاه را می‌سوزانند و از سوخته آن در جهت واله‌آور استفاده می‌کنند. از ریشه این گیاه جوشانده غلیظی درست می‌کنند که برای درمان جوش‌ها بسیار مفید می‌باشند، زیرا خاصیت ضدعفونی کننده دارد (Chen et al. 2011).

فصل دوم

مروری بر منابع

۲- استخراج، خالص‌سازی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدها

هو[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی‌ساکارید ساقه گیاه آکانتوپاناکس براچیپوس[۲] را توسط آب مقطر در دمای ۸۰°C (۱۰ ساعت، با نسبت یک قسمت گیاه به ۱۰ قسمت آب) استخراج کردند. جداسازی ترکیبات غیر ضروری توسط اتانول در دمای ۴°C انجام گرفت. برای خالص‌سازی پلی‌ساکارید خام از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز استفاده شد و ۲ فراکشن با وزن مولکولی $۱/۰۶\times۱۰^{۵}$ و $۸/۲۵\times۱۰^{۳}$ دالتون بدست آمد. برای شناسایی ساختار فراکشن‌ها ترکیبی از روش‌های متیلاسیون، هیدرولیز اسیدی ملایم، اکسیداسیون پریودات، تجزیه اسمیت، طیف‌سنجی NMR و FTIR استفاده شد. طبق نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی، پلی‌ساکارید خالص یک هتروپلی‌ساکارید اسیدی متشکل از واحدهای گالاکتوز، گلوکز، رامنوز و اسید گالاکتورونیک با نسبت مولی به ترتیب ۱:۲:۲:۳ بود. ساختار پیشنهاد شده برای پلی‌ساکارید خالص در شکل ۲-۱ آمده است (Hu, Liang, & Wu, 2015).



شکل ۲-۱: ساختار پیشنهاد شده برای پلی‌ساکارید حاصل از ساقه گیاه آکانتوپاناکس براچیپوس

گوو[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۵ از ریشه‌های گیاه جینسنگ آمریکایی[۴] پلی‌ساکاریدی غیرنشاسته‌ای استخراج و خالص‌سازی کردند. استخراج با آب داغ ۸۰ °C و جداسازی با کمک اتانول (نسبت۱:۳) انجام شد. پروتئین و نشاسته نیز توسط آنزیم‌های پروتئاز و α- آمیلاز حذف شدند.

---

۱ - Hu

۲ - *Acanthopanax brachypus*

۳ - Guo

۴ - *American ginseng*

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و جزئیات ساختار پلی‌ساکارید خالص با استفاده از کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا (HPSE)[1]، طیف‌سنج مادون قرمز، آنالیز متیلاسیون و طیف‌سنج NMR تک بعدی و دو بعدی بررسی شد. میانگین وزن مولکولی و ویسکوزیته ذاتی پلی‌ساکارید به ترتیب ۸۵/۴ کیلودالتون و ۰/۴۱ dl/gr بود. ترکیبات مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید رامنوز، آرابینوز، گالاکتوز، گلوکز و اسید اورونیک با نسبت وزنی ۱:۴:۸:۸:۵۰ بودند. براساس آنالیز متیلاسیون، اسید گالاکتورونیک جزء غالب پلی‌ساکارید خالص بود (Guo et al. 2015).

پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی از برگ‌های گیاه آمپلوپسیس مگالوفیلا[2] توسط زای[3] و همکاران در سال ۲۰۱۵ جداسازی شد. مرحله استخراج و خالص سازی با کمک اتانول در دمای °C ۱۰۰ و سپس پروتئین زدایی به روش سواگ انجام شد. خالص‌سازی بیشتر با ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ انجام شد. وزن مولکولی پلی‌ساکارید $۸/۴\times۱۰^{۴}$ دالتون و واحدهای مونومری آن گالاکتوز، مانوز، گلوکز و رامنوز با نسبت مولی ۲/۷: ۱/۶: ۱/۱: ۰/۶: ۰/۳ بود (Xie, Wang, & Zhang, 2015).

پلی‌ساکارید ریشه گیاه لپیدیوم میئنی[4] توسط ژا[5] و همکاران در سال ۲۰۱۴ استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. استخراج با آب داغ °C ۸۰ به مدت ۱ ساعت انجام شد. برای خالص سازی، ابتدا از آنزیم آمیلاز، جهت حذف نشاسته، استفاده شد، سپس حذف پروتئین به روش سواگ انجام گرفت. عمل ترسیب پلی‌ساکارید با استفاده از اتانول در غلظت‌های ۶۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪ و ۹۰٪ صورت گرفت و در نهایت چند فراکشن جداسازی و توسط استون، اتانول مطلق و اتر شسته شدند. واحدهای مونوساکاریدی سازنده این فراکشن‌ها، رامنوز، آرابینوز، گلوکز و گالاکتوز با نسبت‌های متفاوت بود (Zha et al.2014).

---

۱ - High Pressure Size Exclusion Chromatography

۲ - *Ampelopsis megalophylla*

۳ - Xie

۴ -*Lepidium meyenii*

۵ - Zha

هی[1] و همکاران در سال ۲۰۱۴ چهار پلی‌ساکارید محلول در آب از میوه بالنگ انگشتی[2] با استفاده از آب داغ و اتانول استخراج کردند. براساس منحنی کالیبراسیون، وزن مولکولی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده ۱۱۳/۹: ۳۲/۶: ۱۴۰/۳: ۱۷۷/۱ کیلودالتون تخمین زده شد (He, Liang, Zhang, & Pan, 2014).

ژانگ[3] و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی از گیاه آگاوِ سیسالانا[4] جداسازی کردند. بررسی مونوساکاریدهای سازنده نشان داد که این پلی‌ساکارید از گالاکتوز، گلوکز، مانوز، رامنوز، آرابینوز و اسید گالاکتورونیک با نسبت‌های مولی ۳: ۲/۴: ۱/۴: ۱: ۰/۲: ۰/۲ تشکیل شده است. آنالیزهای شیمیایی نشان دادند که زنجیره اصلی پلی‌ساکارید از D-گالاکتوپیرانوز با اتصال β(۱→۴)، D-گلوکوپیرانوز با اتصال β(۱→۳)، D- مانوپیرانوز با اتصال α(۱→۳)، L-رامنوپیرانوز با اتصال α(۱→۲) با نسبت‌های مولی به ترتیب ۳: ۱: ۱: ۱ تشکیل شده است. برخی از واحدهای گلوکز، مانوز و رامنوز در زنجیره اصلی، دارای انشعاب بودند (Zhang, Liu, & Lin, 2014).

تانگام[5] و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از گیاه کیمبوپوجون سیتراتوس[6]، با آب داغ °C ۹۹/۶۶ و زمان ۱۱۳/۸۱ دقیقه تحقیق کردند. پلی‌ساکاریدهای استخراج شده توسط کروماتوگرافی ژل تراوا و تبادل یونی خالص‌سازی و دو فراکشن پلی‌ساکارید بدست آمد. آنالیز طیف NMR حضور D-زایلو فورانوز با اتصال β(۱→۴) در فراکشن‌ها را نشان داد. فراکشن غالب دارای واحدهای مونومری گلوکز، گالاکتوز، زایلوز و مانوز با نسبت مولی ۱: ۲/۲: ۱۴/۶: ۰/۶۳ و ۷/۸ ٪ اورونیک اسید بوده و زایلوز، مونوساکارید غالب اسکلت اصلی زنجیره است. وزن مولکولی فراکشن

---

۱ - He
۲ - *Finger citron fruits*
۳ - Zhang
۴ - *Agave sisalana*
۵ - Thangam
۶ - *Cymbopogon citratus*

غالب ۴۵ کیلودالتون تخمین زده شد (Thangam, Suresh, & Kannan, 2014).

ما[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۴ یک پلی‌ساکارید جدید محلول در آب از قارچ پلِئوروتوس اِرینگی[۲] جدا و خالص‌سازی کردند. جهت این کار نمونه در آب مقطر ۷۰ °C، به مدت ۱۴۰ دقیقه قرار گرفت و سپس سانتریفیوژ و پروتئین زدایی انجام شد. حذف پروتئین به روش سواگ و خالص‌سازی بیشتر توسط ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد. پس از خالص‌سازی ۳ فراکشن پلی-ساکاریدی بدست آمد و وزن مولکولی آنها توسط کروماتوگرافی HPSEC ۲۰۸، ۱۲ و ۴۱۳ کیلو دالتون تخمین زده شد. ترکیب مونوساکاریدی و نسبت آن‌ها در ۳ فراکشن با کمک کروماتوگرافی گازی بررسی شد و مشخص گردید که فراکشن ۱ از واحدهای مونوساکاریدی مانوز، گلوکز، گالاکتوز و زایلوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۸/۰۱ : ۷۴/۸۲ : ۱۱/۱۴ :۱/۲۴، فراکشن ۲ از واحدهای مانوز، گلوکز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۵/۲۳ : ۸۶/۷ :۵/۱۲ و فراکشن ۳ از واحدهای مانوز، گلوکز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۴/۰۸ :۹۰/۹۳: ۲/۸۹ تشکیل شده است. مقدار اسید اورونیک فراکشن‌ها نیز به ترتیب ۱/۰۵، ۲/۰۴ و ۲/۱۶ درصد محاسبه شد. با بررسی داده‌های موجود، نتیجه‌گیری شد که پلی‌ساکاریدهای حاصل از نوع هترو و عمدتا از گلوکز تشکیل شده است (Ma et al. 2014).

شاخماتوو[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی‌ساکارید محلول در آب از قسمت‌های برگ، گل و ساقه گیاه هِراکلِئوم ساسنو اِسکایی ماندِن[۴] را استخراج و ساختار آن را مورد بررسی قرار دادند. استخراج با کمک آب مقطر ۷۰ °C به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از تغلیظ و ترسیب، خالص‌سازی صورت گرفت که در نتیجه آن ۵ فراکشن پلی‌ساکاریدی بدست آمد. آنالیز مونوساکاریدهای سازنده وجود مقادیر زیادی اسید D- اورونیک ، D-گالاکتوز و L-آرابینوز را نشان داد. آنالیز طیف‌سنجی NMR نشان داد

۱ - Ma
۲ - *Pleurotus eryngii*
۳ - Shakhmatov
۴ - *Heracleum sosnowskyi Manden*

که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید اساسا از واحدهای گالاکتوپیرانوز با اتصالات (۳→۱) و (۶و۳→۱) تشکیل شده است (Shakhmatov, Toukach, Kuznetsov, & Makarova, 2014)

کوی[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی‌ساکارید خام میوه گیاه فروتوس جوجوبائی[۲] را استخراج و شناسایی کردند. طبق این تحقیق، استخراج در دمای ۹۰ °C (نسبت۱:۳۳، با ۳ مرتبه تکرار) به مدت ۳/۲۳ ساعت انجام شد. پلی‌ساکارید حاصل توسط ستون کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز خالص-سازی شد و دو فراکشن همگن با نام‌های RQP_1 و RQP_2 با وزن مولکولی به ترتیب ۸۳/۸ و ۱۲۳ کیلو دالتون جداسازی گردید. پس از آنالیزهای شیمیایی مشخص شد که مونوساکاریدهای عمده فراکشن RQP_1، آرابینوز، زایلوز و گالاکتوز با نسبت مولی ۲۳/۴۴: ۱۸/۷۶: ۳۱/۱۴ و مونوساکاریدهای عمده فراکشن RQP_2، آرابینوز و زایلوز با نسبت مولی ۳۲/۷۸: ۳۵/۷۲ بود (Cui et al. 2014).

وو[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۴ استخراج پلی‌ساکارید را از قارچ کوردیسپس سینِنسیس[۴] با استفاده از آب مقطر در دمای جوش (۱ساعت، نسبت ۱:۵) انجام دادند. برای جداسازی ترکیبات چربی و غیر ضروری نمونه، از اترنفت و اتانول ۷۰٪ استفاده شد. پس از جداسازی پلی‌ساکارید، محلول از غشای اولترا فیلتراسیون عبور داده شد و در نهایت ترکیبات با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون جدا و خشک شدند. پلی‌ساکارید به دست آمده از نوع هترو و بسیار منشعب با درجه انشعاب ۴۳/۳ ٪ و وزن مولکولی ۲۲/۳۷ کیلودالتون گزارش شده است. مقدار قند کل ۹۲/۶ ٪ محاسبه شد.

آنالیزهای شیمیایی و دستگاهی مانند طیف‌سنج مادون قرمز و GC-MS بر روی آن انجام گرفت که نشان داد مونوساکاریدهای سازنده پلی‌ساکارید، مانوز، گالاکتوز و گلوکز با نسبت مولی ۴/۴: ۳/۸: ۱ است و زنجیره اصلی از مانوز با اتصال (۲→۱) تشکیل شده است (Wu et al. 2014).

---

۱ - Cui

۲ - *Frutus jujubaie*

۳ - Wu

۴ - *Cordyceps sinensis*

چِنگ[1] و همکاران در سال ۲۰۱۳ پلی‌ساکارید گیاه اِپیمِدیوم آکومیناتوم[2]را با آب داغ ۸۵/۶۷ °C و زمان۳/۵۷ ساعت استخراج کردند. پس از خالص‌سازی ۳ فراکشن به نام‌های EAP_{40}، EAP_{60} و EAP_{80} حاصل شد که وزن مولکولی EAP_{40} و EAP_{60} به ترتیب ۱۳۸/۸۸۴ و ۱۱۴/۶۶۷ دالتون محاسبه شد. پلی‌ساکارید EAP_{40} عمدتا از واحدهای از گلوکز و مانوز و پلی‌ساکارید EAP_{60} از واحدهای گلوکز و گالاکتوز تشکیل شده بود. گالاکتوز مونوساکارید اصلی موجود در اسکلت پلی‌ساکارید EAP_{80} با درصد مولی ۵۵/۵۶ ٪ بود. پلی‌ساکارید جدیدی توسط زین[3] و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ریشه‌های گیاه پولیگالا تِنوئیفولیا[4] استخراج و جداسازی شد. ترکیب مونوساکاریدی سازندهٔ این پلی‌ساکارید گالاکتوز، گلوکز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۳/۱: ۳/۷: ۲/۵ و مقدار کمی رامنوز، زایلوز و مانوز بود. خالص‌سازی پلی‌ساکارید خام توسط ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل-سفاسِل و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد (Cheng et al. 2013).

ژانگ[5] و همکاران در سال ۲۰۱۲ هترو پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی را از میوه فلامولینا وِلوتیپس[6] توسط آب گرم استخراج و سپس با سفارسیل اس-۳۰۰ و اس-۴۰۰ خالص کردند. وزن مولکولی این پلی‌ساکارید $۱/۳\times۱۰^{۴}$ دالتون تخمین زده شد.

واحدهای مونومری آن L-فوکوز، D-مانوز، D-گلوکز و D-گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱/۱۶: ۰/۸۲: ۳/۱:۰۸ بودند. آنالیز متیلاسیون همراه با طیف‌سنجی دو بعدی C-NMR و H-NMR نشان داد که این پلی‌ساکارید از اسکلت D-گالاکتوپیرانان با اتصال α(۱→۶) با انتهای فوکوز و گلوکز، واحدهای D-مانوپیرانان با اتصال (۱→۶) روی گروه O-۲ از استخلاف O-۲،۶ واحدهای D-گالاکتوز

---

۱ - Cheng
۲ - *Epimedium acuminatum*
۳ - Xin
۴- *Polygala tenuifolia*
۵ - Zhang
۶ - *Flammulina velutipes*

تشکیل شده‌اند. فقدان پیک در ناحیه cm^{-1}(۱۷۳۰) نشان‌دهنده عدم وجود اسید اورونیک و در ساختار پلی‌ساکارید بود (Zhang, Xiao, Deng, He, & Sun, 2012).

کی[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۱ از میوه‌های خشک شده گیاه لیسیوم باربارروم[۲] برای استخراج پلی‌ساکارید استفاده کردند. جداسازی ترکیبات غیر ضروری، با استفاده از اتانول ۹۵٪ و دمای ۷۵ °C انجام شد. استخراج با آب مقطر در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. برای خالص‌سازی پلی-ساکارید از ستون کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ استفاده شد و ۶ فراکشن پلی‌ساکاریدی جدا گردید که یکی از آن‌ها با مقدار ۷۹/۵۳٪ و وزن مولکولی $۵/۳\times۱۰^{۴}$ دالتون به عنوان فراکشن غالب برای تجزیه و تحلیل ترکیبات مونوساکاریدی توسط کروماتوگرافی گازی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از GC نشان داد که پلی‌ساکارید غالب از واحدهای آرابینوز، مانوز، زایلوز، گلوکز و رامنوز تشکیل شده است (Ke et al. 2011).

یک پلی‌ساکارید محلول در آب از ریشه‌های گیاه افیوپجون ژاپنی[۳]، با کمک استخراج با آب گرم، توسط چن[۴] و همکاران در سال ۲۰۱۱ حاصل شد. پس از ترسیب با اتانول، جهت خالص‌سازی بیشتر از ستون تبادل یونی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس جی-۱۰۰ استفاده شد. نتایج نشان داد که متوسط وزن مولکولی این پلی‌ساکارید۳۵/۲ کیلودالتون و واحدهای مونوساکاریدی سازندهٔ آن شامل آرابینوز، گلوکز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۸:۱۶:۱ است. گلوکز و گالاکتوز واحدهای سازنده شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید است و محل اتصالات شاخه‌های جانبی به زنجیره اصلی، از محل کربن شماره ۴ گلوکزهای زنجیره اصلی است (Chen et al. 2011).

---

۱ - Ke

۲ - *Lycium barbarum*

۳ - *Ophiopogon japonicus*

۴ - Chen

لی[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۱ پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی از میوه گیاه زیزیپوس جوجوب[۲] توسط آب داغ ۸۰ °C استخراج کردند. محلول پلی‌ساکارید خام توسط ستون تبادل یونی دی‌اتیل‌آمینواتیل سفارزCL-6B و سفادکس جی-۲۰۰ خالص‌سازی شد و ۴ فراکشن پلی‌ساکاریدی پس از شستشوی ستون حاصل شد. میانگین وزن مولکولی فراکشن پلی‌ساکاریدی غالب $۱/۴\times۱۰^{۵}$ دالتون و واحدهای مونومری سازندهٔ آن رامنوز، D-آرابینوز و D-گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۸:۲:۱ بودند. ویژگی‌های ساختاری فراکشن پلی‌ساکاریدی غالب توسط هیدرولیز اسید جزئی (ناقص)، آنالیز متیلاسیون و طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای تخمین زده شد که بررسی نتایج مشخص کرد که اسکلت اصلی این پلی‌ساکارید واحدهای D-گالاکتوپیرانوزیل با اتصالات (۴→۱)، همراه با رامنوپیرانوزیل با اتصالات (۲→۱) و (۲،۴→۱) است (Li, Fan, & Ding, 2011).

لیانگ[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۱ از میوه‌های خشک شده لیسیوم باربارروم[۴] برای بدست آوردن پلی‌ساکارید استفاده کردند. در این بررسی نمونه در دستگاه سوکسله با اترنفت (دمای ۶۰-۹۰ °C) چربی زدایی شد و سپس از اتانول (۲ مرتبه) استفاده گردید. استخراج پلی‌ساکارید از نمونه توسط آب داغ و خالص‌سازی توسط ستون کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز انجام شد. وزن مولکولی پلی-ساکارید غالب شسته شده از ستون، $۱/۲\times۱۰^{۵}$ دالتون تخمین زده شد (Liang, Jin, & Liu, 2011).

لو[۵] و همکاران در سال ۲۰۱۰ پلی‌ساکاریدهای محلول در آب را از ساقه گیاه دندروبیوم نوبیل[۶]، توسط آب داغ استخراج کردند. خالص‌سازی، توسط ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفاکس جی-۲۰۰ انجام شد و در نهایت ۴ فراکشن پلی‌ساکارید به نام‌های DNP1-1، DNP2-1،

---

۱ - Li
۲ - *Zizyphus jujube*
۳ - Liang
۴ - *Lycium barbarum*
۵ - Luo
۶ - *Dendrobium nobile*

DNP3-1، DNP4-2 بدست آمد. با بررسی نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل تراوا [1](GPC)، میانگین وزن مولکولی پلی‌ساکاریدهای نام برده به‌ترتیب ۱۳۶، ۲۷/۷، ۱۱/۸ و ۱۱/۴ کیلو دالتون تخمین زده شد و مونوساکاریدهای غالب در پلی‌ساکاریدها، مانوز، گلوکز، گالاکتوز و مقدار کمتری آرابینوز، رامنوز و زایلوز بودند (Luo et al.2010).

سون[2] و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای استخراج و خالص‌سازی پلی‌ساکارید محلول در آب از ریشه‌های گیاه بوپلِئوروم چینِنزه[3] به ترتیب از آب داغ ۸۰ °C و دی‌اتیل‌آمینواتیل سفارز همراه با سفارسیل اس-۲۰۰ استفاده کردند. پلی‌ساکارید استخراج شده دارای وزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون و واحدهای مونومری سازندهٔ آن آرابینوز، گالاکتوز و گلوکز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۲/۱: ۲/۵: ۱ بودند. با بررسی نتایج حاصل از FT-IR، هیدرولیز اسیدی جزئی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، آنالیز متیلاسیون و کروماتوگرافی گازی، ساختار پلی‌ساکارید مشخص گردید. نتایج نشان داد که آرابینوز با اتصالات (۵→۱)، گالاکتوز با اتصالات (۴→۱) و (۳→۱) سازندهٔ اسکلت اصلی پلی‌ساکارید هستند و شاخه‌های فرعی از واحدهای گلوکز با اتصالات (۴→۱) تشکیل شده است (Sun et al. 2010).

زای[4] و همکاران در سال ۲۰۱۰ از برگ‌های گیاه سیکلوکاریا پالیوروس[5] جهت استخراج یک پلی‌ساکارید محلول در آب، توسط آب داغ ۸۰ °C استفاده کردند. خالص‌سازی این پلی‌ساکارید با استفاده از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل سفادکس و سفارسیل اس-۴۰۰ صورت گرفت. وزن مولکولی پلی‌ساکارید سازنده ۱۱۶۷ کیلودالتون تخمین زده شد. نتایج حاصل از آنالیز مونوساکاریدهای تشکیل دهندهٔ پلی-ساکارید خالص نشان داد که واحدهای مونوساکاریدی سازنده، زایلوز، آرابینوز، گلوکز، گالاکتوز، رامنوز و مانوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱: ۹/۶۷: ۹/۶۵: ۴/۹۶: ۳/۲۹: ۲/۷ هستند (Xie et al. 2010).

---

۱ -Gel permeation chromatography

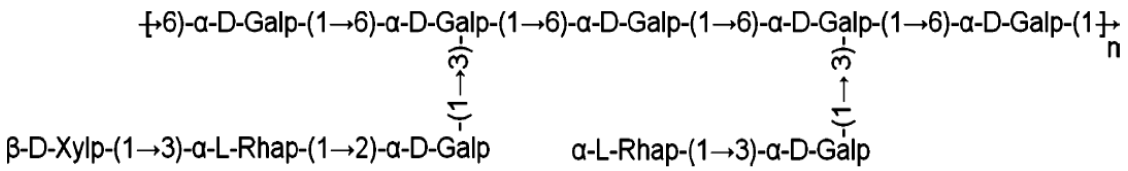
۲ - Sun

۳ - *Bupleurum chinense*

۴ - Xie

۵ - *Cyclocarya paliurus*

استخراج یک پلی‌ساکارید محلول در آب جدید از ریشه گیاه تاکسوس یونانِنسیس[۱] توسط یین[۲] و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از آب داغ ۹۰ °C انجام شد. فرایند خالص‌سازی پلی‌ساکارید با استفاده از کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفارسیل اس-۱۰۰ صورت گرفت و در نهایت پلی‌ساکارید خالص بدست آمده بررسی شد. بررسی مطالعات ساختاری نشان داد که وزن مولکولی این پلی‌ساکارید ۱۷/۳۷ کیلودالتون و واحدهای مونومری سازندهٔ آن رامنوز، گالاکتوز و زایلوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۲: ۶/۷۴: ۱ هستند. نتایج حاصل از آنالیز متیلاسیون، هیدرولیز اسیدی ناقص، اکسیداسیون پریودات، طیف‌سنج جرمی و NMR نشان داد که اسکلت زنجیره اصلی پلی‌ساکارید از واحدهای گالاکتوز با اتصالات (۶→۱) تشکیل شده است که به‌صورت یک در میان در کربن شماره ۳ گالاکتوز شاخه‌دار می‌شود. گالاکتوز و رامنوز، واحدهای سازنده شاخه‌های فرعی هستند و شاخه‌ها با واحدهای مونومری رامنوز و زایلوز به پایان می‌رسند. ساختار پلی‌ساکارید به دست آمده در شکل ۲-۲ آورده شده است. (Yin et al. 2010).



شکل ۲-۲: ساختار پلی‌ساکارید خالص به دست آمده از ریشه گیاه تاکسوس یونانِنسیس

۱ - *Taxus yunnanensis*

۲ - Yin

زانگ[۱] و همکاران درسال ۲۰۰۹ از ریشه‌های گیاه پاناکس جینسِنگ[۲] پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی استخراج کردند. فرایند استخراج با کمک آب مقطر در دمای جوش صورت گرفت و خالص-سازی نمونه با استفاده از ستون‌های دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۷۵ انجام شد (Zhang et al. 2009).

یو[۳] و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از سود ۰/۳ مولار، پلی‌ساکارید موجود در قارچ کردیسپس میلیتاریس[۴] را استخراج کردند. خالص‌سازی با استفاده از ستون‌های دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفارسیل اس-۱۰۰ انجام شد. پلی‌ساکارید خالص شده توسط کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج وجود واحدهای مونوساکاریدی مانوز، گالاکتوز و گلوکز با نسبت‌های مولی ۲/۸۱: ۴/۰۲: ۱ را در ساختار پلی‌ساکارید نشان داد (Yu et al. 2009).

پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی از دانه گرده گیاه کراتائگوس پیناتیفیدا[۵] توسط لی[۶] و همکاران در سال ۲۰۰۹ حاصل شد. استخراج توسط آب داغ به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت و پس از خالص‌سازی ۲ فراکشن به نام‌های CCP-1 و CCP-2 جداسازی و آنالیز شدند. میانگین وزن مولکولی این دو پلی‌ساکارید به ترتیب $۳/۷\times۱۰^{۵}$ و $۷/۸\times۱۰^{۴}$ محاسبه شد. پس از بررسی‌های انجام شده روی دو پلی‌ساکارید توسط کروماتوگرافی گازی، طیف‌سنج مادون قرمز (FTIR) و آنالیز متیلاسیون مشخص گردید که فراکشن CCP-1 از مونومرهای L-رامنوز، L-فوکوز، D-آرابینوز، D-زایلوز، D-مانوز، D-گالاکتوز و D-گلوکز با نسبت مولی ۰/۶۷: ۰/۴۴: ۱۰/۱۶: ۰/۶۶: ۱/۰۳: ۵/۵: ۱۰ و فراکشن CCP-2 از مونوساکاریدهای L-رامنوز، D-آرابینوز، D-مانوز، D-گالاکتوز و D-گلوکز با نسبت مولی ۲/۱۲: ۹/۹: ۳/۶: ۰/۸۹: ۵/۶ و مقدار کمی اورونیک اسید تشکیل شده است. مونوساکارید غالب در هر دو فراکشن،

---

۱ - Zhang
۲ - *Panax ginseng*
۳ - Yu
۴ - *Cordyceps militaris*
۵ - *Crataegus pinnatifida*
۶ - Li

آرابینوز و گلوکز است (Li, Yuan, & Rashid, 2009).

مِنگییانگ[1] و همکاران در سال ۲۰۰۹ برای استخراج پلی‌ساکاریدهای موجود در ریشه گیاه موریندا آفیسینالیس[2] از آب داغ با نسبت ۱:۵ استفاده کردند. ترسیب پلی‌ساکارید موجود در عصاره آبی توسط افزودن اتانول در دمای ۵ °C انجام شد. سپس جهت خالص‌سازی بیشتر از ستون دی‌اتیل‌آمینو-اتیل سلولز استفاده شد در نهایت ۳ فراکشن پس از شستشوی ستون حاصل شد. نتایج آنالیز HPLC نشان داد که پلی‌ساکارید عمدتاً از واحدهای مونومری گلوکز و فروکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱/۲۹: ۲/۷۹ تشکیل شده است (Mengyong et al. 2009).

وو[3] و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از آب ۱۰۰ °C، پلی‌ساکاریدهای محلول در آب موجود در برگ‌های گیاه تاکسوس چاینِنسیس[4] را استخراج کردند. فرایند خالص‌سازی این پلی‌ساکاریدها با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی و غربال مولکولی انجام شد. بررسی نتایج نشان داد که پلی-ساکاریدهای خالص‌سازی شده از نوع اسیدی و هترو بوده‌اند. وزن مولکولی با استفاده از کروماتوگرافی گازی، ۳۴۴ کیلودالتون محاسبه شد (Wu, Wu, Zhou, & Pan, 2009).

لو[5] در سال ۲۰۰۸ ریشه گیاه دیسکورا نیپونیکا[6] را از نظر وجود پلی‌ساکارید بررسی کردند. فرایند استخراج با استفاده از آب داغ ۹۰ °C بود، طی آن چندین پلی‌ساکارید استخراج و فرایند خالص-سازی توسط دی‌اتیل‌آمینواتیل سفاروز و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد. فراکشن خنثی غالب جهت آنالیزهای شیمیایی بیشتر جداسازی شد. واحدهای سازنده فراکشن غالب گلوکز و مانوز با نسبت مولی ۴۵: ۱ و وزن مولکولی ۳۸ کیلو دالتون بود.

---

۱ - Mengyong
۲ - *Morinda officinalis*
۳ - Wu
۴ - *Taxus chinensis*
۵ - Luo
۶ - *Dioscorea nipponica*

آنالیز تجزیه اسمیت-اکسیداسیون پریودات نشان داد که ۵/۹ ٪ اتصالات گلیکوزیدی (→۱)، ۴/۹۴ ٪ اتصالات (۲→۱)، ۶۱/۱۶ ٪ اتصالات (۴→۱)، ۲۸ ٪ اتصالات (۳→۱) در پلی‌ساکارید وجود دارد (Luo, 2008)

زائو[۱] و همکاران در سال ۲۰۰۵ پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی، از ریشه‌های گیاه دیسکورا اوپوزیتا[۲] توسط استخراج با آب سرد بدست آوردند. فرایند خالص‌سازی این پلی‌ساکارید با استفاده از دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفادوکس جی-۱۰۰ انجام شد. وزن مولکولی پلی‌ساکارید ۴۲ کیلودالتون و از واحدهای مونوساکاریدی گلوکز، مانوز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱: ۰/۳۷: ۰/۱۱ تشکیل شده بود. آنالیزهای شیمیایی و دستگاهی نظیر کروماتوگرافی گازی، آنالیز متیلاسیون، اکسیداسیون پریودات، طیف‌سنج مادون قرمز و طیف‌سنج NMR نشان داد که ساختار اسکلت اصلی پلی‌ساکارید از واحدهای گلوکوپیرانوز با اتصالات α(۱→۳) و شاخه‌های جانبی از واحدهای مانوپیرانوز با اتصالات α(۱→۲) تشکیل شده است (Zhao, Kan, Li, & Chen, 2005).

دانگ[۳] و همکاران در سال ۲۰۰۳ پلی‌ساکارید جدیدی از ریشه‌های گیاه سوفورا سابپروستراتا[۴] استخراج و ساختار آن را بررسی کردند. مراحل جداسازی و استخراج شامل حذف ترکیبات غیر ضروری به کمک اتانول به مدت ۱۶ ساعت و استخراج پلی‌ساکارید توسط آب جوش (با نسبت ۱:۲۰) صورت گرفت. از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل-سفادکس ۲۵ -A برای خالص‌سازی بیشتر استفاده شد و در نهایت ۴ فراکشن به نام‌های SSa_1، SSa_2، SSa_3 و SSa_4 بدست آمد. فراکش غالب پلی‌ساکارید SSa_1 بود که توسط شستشوی ستون با آب مقطر و سایر فراکشن‌ها توسط شستشو با کلرید سدیم حاصل شدند (Dong, Yao, & Fang, 2003).

---

۱ - Zhao

۲ - *Dioscorea opposita*

۳ - Dong

۴ - *Sophora subprostrata*

دوآن[1] و همکاران در سال ۲۰۰۳ پلی‌ساکارید محلول در آب برگ‌های گیاه دیوسپیروس کاکی[2] توسط آب داغ استخراج کردند. برای خالص‌سازی پلی‌ساکارید، از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل-آمینواتیل سلولز و سفارسیل اس-۳۰۰ استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیزهای شیمیایی نشان داد که فراکشن بدست آمده هتروگلیکان اسیدی محلول در آب، با درجه چرخش نوری °۱۹/۹- است. واحدهای سازنده این پلی‌ساکارید رامنوز، آرابینوز، زایلوز، گالاکتوز و گالاکتورونیک اسید در نسبت مولی ۱: ۴/۵: ۰/۷: ۱/۵: ۱ به همراه ۵/۷ ٪ گروه استیل است. وزن مولکولی ۹ کیلودالتون محاسبه شد. زنجیره اسکلت اصلی [→۴)-α - GalA*p*-(1→2)-α-Rha*p*-(*1*→] می‌باشد (Duan, Wang, Dong, Fang, & Li, 2003).

گلوکومانان‌ها، هتروپلی‌ساکاریدهایی با واحدهای سازنده D-گلوکز و D-مانوز همراه با گروه‌های استیل هستند. گروه‌های استیل به طور معنی داری ساختار گلوکومانان را تحت تاثیر قرار می‌دهند که این امر انحلال پذیری در آب و تورم گلوکومانان، ذخیره سازی و عملکرد احتباس آب توسط آن‌ها در گیاهان را تعیین می‌کند. این پلی‌ساکاریدها در واکوئل‌های سلول‌های پارانشیم ریشه گیاهان قرار گرفته-اند. حداکثر تجمع آنها در غده‌ها مربوط به شروع شرایط محیطی دشوار (مانند فصل‌های گرم و خشک) است. در این دوره ریشه‌های گیاه به حداکثر اندازه خود رسیده و از یک تورم زیاد برخوردار می‌شوند. گلوکومانان‌ها کاربردهای گسترده‌ای در مواد غذایی مختلف، محصولات دارویی و آرایشی بهداشتی دارند. صرف نظر از مسایل بیولوژیکی کلی، گلوکومانان گیاه از بعضی کاربردهای عملی به عنوان قوام دهنده غیر سمی، امولسیفایرها و افزودنی‌های فعال فیزیولوژیکی در مواد غذایی و دارویی برخوردار هستند؛ آنها همچنین به عنوان منبع مانوز در روسیه استفاده می‌شوند. ریشه‌های بعضی از گیاهان خانواده لیلیاسه متعلق به جنس سریش، محتوی مقادیر پلی‌ساکاریدهای گلوکومانان محلول در آب هستند. از کارهای انجام شده بر روی گونه‌های این جنس به موارد زیر می‌توان اشاره کرد.

---

۱ - Duan

۲ - *Diospyros kaki*

یک گالاکتومانان جدید از ریشه گیاه سریش آنیسوپتِروس[1] توسط هو[2] و همکاران در سال ۲۰۱۰ باکمک آب در دمای اتاق استخراج شد. حذف پروتئین به روش سواگ و ترسیب پلی‌ساکارید با اتانول صورت گرفت. پس از خالص‌سازی توسط ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل- سفارز، پلی‌ساکارید خالص بدست آمد که میانگین وزن مولکولی آن ۶ کیلو دالتون و واحدهای سازنده آن، گالاکتوز و گلوکز با نسبت ۳:۱ بودند. اتصالات موجود در زنجیره نیز از نوع α(۱→۲) و α(۱→۶) بود و گالاکتوز و مانوز به شکل حلقه پیرانوزی در ساختار گلوکومانان وجود داشتند. ساختار پیشنهاد شده برای این پلی‌ساکارید در شکل ۲-۳ آورده شده است. (Hu, Kong, Yang, & Pan, 2010).

$$\text{Glc-}(1\text{-}\{\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}p\text{-}(1\rightarrow[2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow]_3\}\ n\rightarrow 2)\text{-}\ \alpha\text{-D-Man}p$$

$$\mathbf{n \approx 9}$$

شکل ۲-۳: ساختار پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش آنیسوپتِروس

اسمیرنوا[3] و همکاران در سال ۲۰۰۱ گلوکومانان‌های محلول در آب ریشه‌های گیاهان سریش یایی[4] و سریش زانگزوریکوس[5] را مورد مطالعه قرار دادند. گلوکومانان‌های گونه یایی ٪۲۸/۸ D-گلوکز، ٪۶۹ D-مانوز و ٪۲/۲ گروه‌های استیل و گونه زانگزوریکوس، ٪۲۲/۶ D-گلوکز،٪۷۴/۸ D-مانوز و ٪۲/۶ گروه‌های استیل داشتند. طیف IR گلوکومانان‌ها، وجود اتصالات β(۱→۴) و گروه‌های کربونیل استر و طیف C-NMR، ساختار خطی نسبتا استیله شده با اتصالات β–D (1→4) را نشان داد. گروه‌های استیل در موقعیت کربن‌های شماره ۲ و ۳ واحدهای مانوپیرانوز قرار داشتند. درجه چرخش نوری $[\alpha]_D$،

۱ - *Eremurus anisopterus*

۲ -Hu

۳ - Smirnova

۴ - *Eremurus iae*

۵ - *Eremurus zangezuricus*

ویسکوزیته و وزن مولکولی پلی‌ساکارید گیاه یایی به ترتیب °۳۴-، dl/gr ۶/۰۵ و ۲۶۵/۵ کیلودالتون و برای گیاه زانگزوریکوس به ترتیب °۳۸/۲-، dl/gr ۵/۴، ۲۳۳/۵ کیلودالتون گزارش شد. بررسی نتایج حاصل از هیدرولیز کامل اسیدی و کروماتوگرافی گاز-مایع نشان داد که دو مونوساکارید عمده پلی-ساکارید در گونه یایی، مانوز و گلوکز با نسبت‌های ۲/۴: ۱ و در گونه زانگزوریکوس با نسبت‌های ۳/۳: ۱ هستند (Smirnova, Mestechkina, & Shcherbukhin, 2001).

راخیمو[۱] و یولداشوا[۲] در سال ۱۹۹۶ گلوکومانان جدیدی از ریشه‌های گیاه سریش رجلی[۳] جدا کردند. به این نتیجه رسیدند که پلی‌ساکارید گونه مذکور از واحدهای گلوکز و مانوز به ترتیب با نسبت ۱:۲ تشکیل شده است (Rakhimov, & Yuldasheva, 1996).

راخیمو و همکاران در سال ۱۹۸۳ استخراج و تعیین ساختار گلوکومانان حاصل از ریشه گیاه سریش تادشیکروم[۴] را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-۱۰۰، حضور ۴ فراکشن T_1، T_2، T_3 و T_4 را مشخص کرد. در نتیجه هیدرولیز کامل فراکشن‌های T_2 و T_3 به ترتیب واحدهای مونومری گلوکز و مانوز با نسبت‌های ۵:۱ و ۱: ۹/۸ حاصل شد. وزن مولکولی دو فراکشن T_2 و T_3، به‌ترتیب ۶۳×۱۰^{۳} و ۴۷×۱۰^{۳} کیلودالتون تخمین زده شد. آنالیز متیلاسیون برای تشخیص پیوندهای بین واحدهای مونوساکاریدی گلوکومانان انجام گرفت و نتایج نشان داد که واحدهای مونومری در گلوکومانان با اتصالات (۴→۱) متصل شده‌اند و مانوز در انتهای غیراحیاء کننده قرار گرفته است. برای تعیین موقعیت کنفورماسیونی پیوندهای گلیکوزیدی اکسیداسیون با تری اکسید کروم انجام شده و پیوندها از نوع آنومری β تشخیص داده شد (Rakhimov, & Kondratenko, 1983).

---

۱ - Rakhimov

۲ - Yuldasheva

۳ - *Regelii*

۴ - *Eremurus tadshicorum*

بردیکو[1] و همکاران در سال ۱۹۸۲ گلوکومانان جدیدی از ریشه‌های گیاه سریش کریستاتوس[2]، با کمک آب در دمای اتاق استخراج کردند. حذف پروتئین به روش سواگ و ترسیب پلی‌ساکارید با افزودن اتانول صورت گرفت. نتایج حاصل از هیدرولیز اسیدی نشان داد که گلوکومانان عمدتا از واحدهای مونومری گلوکز و مانوز با مقدار بسیار کمی گالاکتوز، آرابینوز و اسید اورونیک تشکیل شده است و نسبت‌های مولی مونوساکاریدهای آرابینوز، گالاکتوز، گلوکز و مانوز به ترتیب ۱: ۲/۲: ۴ /۳: ۷/۱ است. بعد از خالص‌سازی این پلی‌ساکارید، ۲ فراکشن I و II حاصل شد که ترکیبات مونوساکاریدی یکسان داشتند (D-مانوز و D-گلوکز (۱: ۲/۹)). آنالیزهای شیمیایی اکسیداسیون با تری اکسید کروم و متیلاسیون مشخص کرد که گلوکومانان حاصل از گیاه کریستاتوس دارای ساختار خطی با پیوندهای گلیکوزیدی β(۱→۴) و فاقد شاخه است (Berdikeev, Rakhimov, Plekhanova, & Kondratenko, 1982).

پلی‌ساکاریدهای محلول در آب دو گونه سریش لاکتیفِلوروس[3] و لوتئوس[4] توسط ژوماموراتوا[5] و همکاران در سال ۱۹۸۱ بررسی شدند. نتایج حاصل از هیدرولیز اسیدی پلی‌ساکارید لاکتیفِلوروس نشان داد که از واحدهای مونوساکاریدی آرابینوز، گالاکتوز، مانوز، گلوکز و اسید اورونیک تشکیل شده است و نسبت واحدهای گلوکز و مانوز در آن ۵:۱ می‌باشد. بررسی پلی‌ساکارید گونه لوتئوس نیز حضور گلوکز و مانوز با نسبت ۳/۱:۱ و ۹/۱٪ گروه‌های o-استیل را نشان داد. ساختار پیشنهاد شده برای فراکشن غالب به دست آمده از گونه سریش لاکتیفلوروس در شکل ۲-۴ آمده است (Dzhumamuratova, Rakhimov, Shashkov, & Kondratenko, 1981).

---

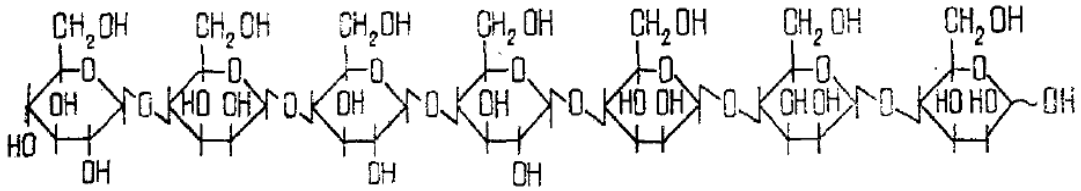
۱ - Berdikeev

۲ - *Eremurus cristatus*

۳ - *Lactiflorous*

۴ - *Luteus*

۵ - Dzhumamuratova



شکل ۲-۴: ساختار فراکشن خالص شده از ریشه گیاه سریش لاکتیفلوروس

ایگامبردیوا[1] و همکاران در سال ۱۹۷۷ پلی‌ساکاریدهای محلول در آب ریشه‌های گیاه سریش آلتائیکوس[2] را با استفاده از آب استخراج و مورد بررسی قرار دادند. بررسی نتایج حاصل از آنالیزهای شیمیایی نشان داد که ساختار پلی‌ساکارید حاصل، از نوع گلوکومانان است و از واحدهای گلوکز و مانوز با نسبت ۱: ۲/۶ تشکیل شده‌است. ساختار پیشنهاد شده برای پلی‌ساکارید ریشه این گونه به صورت شکل ۲-۲ است (Igamberdieva, Rakhimov, & Ismailov, 1977).

D-Manp-(1→4)-D-Manp-(1→4)-D-Glcp-(1→4)-D-Manp-(1→4)-D-Manp(1→4)-D-Manp-(1→4)-D-Manp-(1→4)-D-Glcp) $_n$

- [Glcp-Manp-Manp-Glcp-Manp-Manp-Manp-Manp-] $_n$-

شکل ۲-۵: پلی‌ساکارید شناسایی شده از ریشه‌های گیاه سریش آلتائیکوس

۱ - Igamberdieva

۲ - *Eremurus altaicus*

پلی‌ساکارید محلول در آب ریشه‌های گیاه سریش ترکستانی[۱] توسط راخیمو[۲] و همکاران در سال ۱۹۷۶ استخراج شد. نتایج نشان داد که پلی‌ساکارید استحصال شده از واحدهای مونومری مانوز، گلوکز و مقادیر کمی آرابینوز، گالاکتوز و اسید اورونیک تشکیل شده است. پلی‌ساکارید ذکر شده توسط کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز به دو فراکشن A و B جدا شد که فراکشن A، ۶۶٪ و هیدرولیز اسیدی آن، گلوکز و مانوز را نتیجه داد، در حالیکه فراکشن B از واحدهای مونومری آرابینوز، مانوز، گلوکز، گالاکتوز و اسید اورونیک تشکیل شده بود. ساختار فراکشن غالب A توسط روش‌های اکسیداسیون پریودات، متیلاسیون و هیدرولیز جزئی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که فراکشن A دارای ساختار خطی، متشکل از واحدهای گلوکوپیرانوز و مانوپیرانوز با اتصالات β(۱→۴) است (Rakhimov, Igamberdieva, & Ismailov, 1976)

گودیشکینا[۳] و همکاران در سال ۱۹۷۶ از ریشه‌های گیاه سریش روبوستوس[۴] یک گلوکوفروکتان استخراج کردند. فرایند استخراج توسط آب مقطر در دمای اتاق انجام شد و خالص‌سازی آن توسط ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز صورت گرفت که در نهایت ۲ فراکشن اسیدی و خنثی از پلی‌ساکارید بدست آمد. هیدرولیز اسیدی فراکشن خنثی، حضور واحدهای مونومری گالاکتوز، گلوکز و مقدار کمی آرابینوز و زایلوز و هیدرولیز فراکشن اسیدی حضور واحدهای مونوساکاریدی اسید گالاکتورونیک، گالاکتوز، آرابینوز، رامنوز و مقدار کمی گلوکز و زایلوز را نشان داد (Gudyushkina, Rakhimov, & Ismailov, 1976).

---

۱ - *Eremurus turkestanicus*

۲ - Rakhimov

۳ -Gudyushkina

۴ - *Eremurus rubustus*

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳- مواد اولیه و محلول‌های شیمیایی مورد استفاده

۳-۱- جمع‌آوری ریشه‌های گیاه سریش تماشایی

با توجه به استفاده از ریشه گیاه سریش جهت استخراج پلی ساکارید، این گیاه در بازه زمانی خرداد ماه سال ۱۳۹۳ از منطقه کَرسَنَک واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. شناسایی گونه این گیاه توسط گیاه شناس معروف، دکتر ولی الله مظفریان انجام شد. ریشه‌ها پس از حذف گرد و خاک و سایر مواد اضافی با آب شسته و در مجاورت هوا خشک شدند. پس از خشک شدن ریشه‌ها، توسط دستگاه خردکن، به قطعات ریز ۱ سانتی‌متر خرد شدند.

۳-۲- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده

دکستران با اوزان مولکولی متفاوت (۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون)، دی‌اتیل آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ از شرکت فارماسیا (اُپسالا[۱]، سوئد) خریداری شدند. استاندارد مونوساکاریدهای خالص (د- مانوز، ال- رامنوز، د-گلوکز، د- گالاکتوز، ال- آرابینوز، د- زایلوز و ال- گالاکتورونیک اسید) و دی‌متیل سولفوکساید از شرکت سیگما[۲] (آمریکا) و DSS از شرکت مرک [۳](آلمان) خریداری شدند. اسید تری‌فلوروا ستیک از شرکت فلوکا[۴] خریداری شد. دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده، نظیر انواع اسیدها، بازها و ... از درجه خلوص آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۳-۳- دستگاه‌های مورداستفاده

سانتریفوژ با سرعت rpm ۴۰۰۰ و قابل کاربرد در مقیاس حجمی بالا (۱ لیتری) ساخت شرکت

---

۱ - Uppsala
۲ - Sigma
۳ - Merck
۴ - Fluka

اپندورف[۱]، آلمان. تبخیر کننده دورانی همراه با پمپ‌های خلاء (ساخت شرکت هیدلف[۲] آلمان)، ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم (ساخت شرکت اِی اَند دی[۳] ژاپن)، دستگاه پلاریمتر (پِرکین اِلمِر[۴] ۳۴۳ ساخت کشور آمریکا)، اسپکتروفوتومتر (واریان کری۱۰۰-بیو[۵] ساخت کشور آمریکا)، طیف‌سنج مادون قرمز (نیکولِت[۶] ۵۷۰۰ ساخت کشور آمریکا)، کروماتوگرافی گازی (واریان ۳۴۰۰ ساخت کشور آمریکا)، دستگاه جذب اتمی اسپکترا (۲۲۰ اِف اِس واریان[۷] ساخت کشور آمریکا)، کروماتوگرافی غربال مولکولی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو[۸]) همراه با ستون ژل-تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس اِل[۹] (ساخت توسو[۱۰] ژاپن)، طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای (مدل بروکِر آ وی-[۱۱]۵۰۰ ساخت کشور آلمان)، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی (مدل اِچ پی ۵۸۹۰[۱۲] ساخت کشور آمریکا)، کیسه دیالیز با cut off ۳/۵ کیلودالتون، قیف‌های بوخنر، کاغذهای صافی، دسیکاتور، همزن‌های مغناطیسی[۱۳] مجهز به سیستم حرارتی، سونیکاتور (اُلتراسونیک) و بِن ماری (حمام آب گرم) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

---

۱ - Eppendorf
۲ - Heidolph
۳ - A & D
۴ - Perkin-Elmer
۵ - Varian Cary100-Bio
۶ - Nicolet
۷ - 220 FS Varian
۸ - Shimadzu
۹ - TSK-GEL G3000 PWXL
۱۰ - Tosoh
۱۱ - Bruker AV-500
۱۲ - Hp 5890
۱۳ - Magnetic stirrer

۳-۴- روش‌کار

۳-۴-۱- استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه سریش تماشایی

۳-۴-۱-۱- حذف مواد چربی‌دوست

استخراج از چندین مرحله تشکیل شده است، که با پیشرفت این مراحل مواد غیرمرتبط مانند ترکیبات رنگی، لیپیدها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و مواد کربوهیدراتی حذف می‌شـــوند. با توجه به اینکه ترکیبات غیرضـروری مانند چربی‌ها، رنگ‌دانه‌ها، آمینواسـیدها و ... درجریان اسـتخراج پلی‌سـاکاریدها ایجاد اختلال می‌کنند، بنابراین اولین مرحله در اسـتخراج پلی‌سـاکاریدهای محلول در آب، جداسـازی این مواد غیر ضروری است. در این آزمایش، حذف ترکیبات مزاحم از ریشه‌های خرد شده گیاه توسط اتانل ۹۵٪ انجام شد. حلال اتانول با نسبت ۱:۱۰ و در دمای ۷۰°C استفاده شد. جهت حذف بیشتر ناخالصی‌ها، اتانول مصرف شده با اتانول جدید، هر ۳ ساعت یک‌بار جایگزین شد و در نهایت پس از فرایند صاف کردن، نمونه در مجاورت هوا خشک شدند.

۳-۴-۱-۲- استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب

پس از شستشو با اتانول، جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از ۲۰۰ گرم نمونه گیاهی خشک‌شده فاقد چربی، با استفاده از ۲ لیتر آب ۵۰°C، به مدت ۱۰ ساعت انجام گرفت. این مرحله ۳ بار تکرار شد و در نهایت عصاره‌های آبی حاصل از تمام مراحل، با هم ادغام شدند.

۳-۴-۱-۳- جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب

عصـاره آبی حاصـل از مرحله اسـتخراج با آب، حاوی مخلوطی از پلی‌سـاکاریدها و ترکیبات غیرکربوهیدراتی است که برای جداسازی پلی ساکارید موردنظر، باید خالص شود. پروتئین‌ها، از جمله

مواد غیرکربوهیدراتی هستند که توسط روش‌های مختلفی حذف می‌شوند. در این پژوهش از روش متداول سواگ[1] استفاده شد. میزان حجم کلروفرم مصرفی، ۲۰٪ حجم عصاره آبی و ۱_بوتانول، ۲۰٪ حجم کلروفرم مصرفی بود. فرایند اختلاط به مدت ۰/۵ ساعت انجام گرفت و سپس عصاره آبی- الکلی، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. عصاره آبی فاقد پروتئین در نهایت، از مایع رویی جدا شد. برای حصول اطمینان از صحت عمل و حذف کامل پروتئین‌ها، این مرحله ۳ بار تکرار شد.

۳-۴-۱-۴- ترسیب پلی‌ساکاریدها

پس از مراحل مختلف خالص‌سازی، پلی‌ساکاریدهای موجود در محلول، با استفاده از اتانول رسوب داده شدند. این مرحله با افزودن ۳ حجم اتانول مطلق به عصاره آبی فاقد پروتئین انجام گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۴°C، محلول حاوی اتانول به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و پلی‌ساکارید محلول در آب از محلول آبی- الکلی جدا شد. شستشوی نهایی پلی‌ساکارید بر روی کاغذ صافی و توسط اتانول مطلق و استون انجام گرفت و پلی‌ساکارید در مجاورت هوا خشک شد (Cui, S. W. 2005).

۳-۴-۲- خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها

روش‌های خالص‌سازی مورد استفاده برای کاربرد پلی‌ساکاریدها در صنایع مختلف، با روش‌های خالص سازی مورد استفاده برای شناسایی و تعیین ساختار آن‌ها متفاوت است. با توجه به اینکه شرط لازم برای تشخیص و شناسایی دقیق ساختار پلی ساکارید، بالا بودن درجه خلوص آن است، لذا آزمایش‌های مورد استفاده در خالص‌سازی آن‌ها نیز بسیار دقیق، حساس و پرهزینه است و با تجهیزات بیشتری انجام می‌شود.

---

۱ - Sevag

۳-۴-۲-۱- خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب

پلی‌ساکارید حاصل از مراحل استخراج، جداسازی و ترسیب، ناخالص است و باید برای تعیین ساختار خالص شود. برای انجام خالص‌سازی، ۲ گرم پلی‌ساکارید در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس از ستون کروماتوگرافی حاوی فاز ثابت دی‌اتیل آمینواتیل سلولز عبور داده شد. دی‌اتیل آمینواتیل سلولز برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای خنثی از اسیدی استفاده می‌شود. قبل از ورود آن به ستون، نیاز به چندین مرحله آماده‌سازی است، که اگر این مراحل به درستی انجام نشود، مواد سلولزی وارد نمونه می‌شود و در مراحل بعدیِ شناسایی و تعیین ساختار مشکل ایجاد می‌کند. برای این منظور دی‌اتیل آمینواتیل سلولز خشک با اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال در داخل کریستالیزور مخلوط شده و در دسیکاتور تحت خلاء قرار گرفت. پس از گذشت ۳۰ دقیقه خارج گردید و برای شستشو، توسط آب مقطر بر روی قیف بوخنر منتقل شد. بار دیگر مواد سلولزی با سود ۰/۵ نرمال مخلوط و مرحله قبل تکرار شد.

برای اطمینان از شستشوی کامل فاز ثابت مراحل ذکر شده ۳ بار تکرار شدند. پس از اتمام مراحل شستشو، دی‌اتیل آمینواتیل سلولز داخل محلول ۰/۱ نرمال سود به حالت معلق در آمد و وارد ستون کروماتوگرافی شد و در ادامه عمل شستشوی ستون توسط آب مقطر انجام گرفت. در ادامه نمونه پلی‌ساکارید خام پس از حل شدن در آب مقطر در مقادیری که ذکر شد وارد ستون گردید و شستشوی ستون توسط آب مقطر انجام شد. فراکشن‌گیری از ستون در لوله‌های مجزا و کنترل فراکشن‌گیری توسط روش فنل- اسید سولفوریک انجام شد.

روش کار به این صورت است که طی بازه‌های زمانی مختلف، فراکشن‌هایی از ستون گرفته شد، مقدار ۵ سی‌سی اسید سولفوریک غلیظ و ۱ سی‌سی فنل به ۱ سی‌سی نمونه حاصل از ستون (فراکشن‌ها) اضافه شد. کمپلکس حاصل از تجزیه قند با فنل ایجاد رنگ زرد می‌کند که نشان‌دهنده وجود قند در نمونه است و شدت رنگ ایجاد شده که متناسب با غلظت قند در فراکشن است در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد.

فراکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون دی‌اتیل آمینو اتیل سلولز، برای انجام مراحل خالص‌سازی بیشتر وارد ستون کروماتوگرافی ژل تراوای سفادکس جی- ۱۰۰ (۷۰ cm × ۱/۶ cm) شد. عمل شستشوی ستون مذکور با استفاده از آب مقطر، با سرعت جریان حجمی ۹ میلی‌متر بر ساعت انجام گرفت و در نهایت فراکشن پلی‌ساکارید غالب (اصلی) جمع‌آوری و در نهایت خشک شدند. پلی‌ساکارید محلول در آب بدست آمده برای مطالعات شناسایی و تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت (Whistler, R. L. 1965).

۳-۴-۳- شنا سایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه سریش تماشایی

تجزیه و تحلیل ساختار پلی ساکاریدها، نیازمند تکنیک‌های ویژه‌ای ا ست که این تکنیک‌ها با روش‌های مورد استفاده برای مولکول‌های کوچک و پلی‌مرهای زیستی دیگر متفاوت است. از طرفی پلی‌ساکاریدهای گیاهی برخلاف پلی‌ساکاریدهای باکتریایی، دارای ساختاری پیچیده و واحدهای قندی غیرتکراری هستند. با پیشرفت تکنولوژی در چند دهه اخیر، شناسایی و تجزیه و تحلیل ساختار پلی ساکاریدها ممکن شده ا ست. در زیر مهمترین این روش‌ها که در این پژوهش مورد ا ستفاده قرار گرفته تشریح شده است.

۳-۴-۳-۱- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید غالب موجود در ریشه گیاه سریش تماشایی

همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب، با ا ستفاده از روش کروماتوگرافی ستون سفادکس جی- ۱۰۰ و کروماتوگرافی ژل تراوا با کارآیی بالا، توسط سیستم کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (شیمادزو) همراه با ستون ژل- تی اِس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس اِل ساخت توسو ژاپن (۷/۸ × ۳۰۰ میلی‌متر) انجام گرفت.

شستشوی ستون با استفاده از محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم با سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی‌لیتر بر دقیقه صورت گرفت. آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست نور مدل RID-10A (شیمادزو، ژاپن) بود. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی مشخص (۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۷۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰۰ دالتون) بدست آمد و دمای ستون در طول آزمایش ۴۰°C بود. وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب، با ا ستفاده از منحنی کالیبرا سیون ذکر شده در بالا محاسبه شد (Sun et al. 2010).

۳-۴-۳-۲- طیف‌سنج مادون قرمز

طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید محلول در آب با استفاده از طیف‌سنج مادون قرمز مدل نیکولِت ۵۷۰۰ (مدیسون، آمریکا) بد ست آمد. روش‌کار به‌این صورت بود که ۲-۱ میلی‌گرم پلی ساکارید کاملا خالص با پودر برومور پتاسیم (با درجه خلوص اسپکتروسکوپی) مخلوط و پس از فشرده شدن بصورت قرص یک میلی‌متری مناسب در آمد و در محفظه دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز جهت آنالیز قرار داده‌شد. در نهایت نمودار تغییراتِ درصد نور عبور داده شده، برحسب فرکانس در محدوده cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ رسم شد (Ray, 2006).

۳-۴-۳-۳- تعیین درجه چرخش نوری

برای تعیین درجه چرخش نوری از د ستگاه پلاریمتر پرکین المر ۳۴۳ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. برای انجام آنالیز ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌ساکارید توسط ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در حمام آب‌جوش به مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد. سپس ۵ میلی‌گرم از پلی ساکارید هیدرولیز شده، در یک بالن ژوژه ۵ میلی‌لیتری به حجم ر سانده شد و وارد لوله ۲ د سی‌متری د ستگاه گردید. اندازه‌گیری در دمای ۲۰°C و طول موج ۵۸۹ نانومتر انجام گرفت. در نهایت عدد خوانده شده از دستگاه، در رابطه زیر قرار گرفت و درجه چرخش نوری محاسبه شد (Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F. 1994).

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

در این رابطه، α درجه چرخش نوری پلی‌ساکارید، ´α عدد خوانده شده از دستگاه، L طول لوله و C غلظت بر حسب گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

۳-۴-۳-۴- جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومترِ طیف فرابنفش

پروتئین‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش، دارای بیشترین میزان جذب هستند. بنابراین عدم جذب در این طول موج از طیف، نشانگر عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلوئیک در ساختار پلی‌ساکارید و عملکرد خوب مراحل خالص‌سازی قبلی است. از این‌رو طیف فرابنفش، برای اطمینان از عدم حضور بقایای پروتئینی و خلوص پلی ساکارید مورد استفاده قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که محلولی از پلی‌ساکاریدِ تهیه و وارد سلولی از جنس کوارتز شد. سپس جذب آن در ناحیه ۲۸۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر واریان کری ۱۰۰- بیو (ساخت کشور آمریکا) ثبت شد (Nielsen, S. S. 2010).

۳-۴-۳-۵- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید

تعیین قند کل، توسط روش فنل- اسیدسولفوریک و با استفاده از D- گلوکز به عنوان استاندارد، در طول موج ۴۹۰ نانومتر انجام شد و جهت تعیین کمی و کیفی واحدهای مونو ساکاریدی سازنده پلی ساکارید، از کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳۴۰۰ (ساخت آمریکا) استفاده شد. ستون مورد استفاده، از نوع موئینه[1] مدل دی ام- ۲۳۳۰[2] (۳۰ متر × ۰/۳۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر) و آشکار ساز مورد استفاده از نوع یونش شعله‌ای[3] بود. دمای ستون در ۱۲۰°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای ۲۵۰°C (با نرخ ۸°C/min) افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در دمای نامبرده

۱ - Capillary column
۲ - DM- 2330
۳ - Flame- ionization

نگهداری شد. ازت به عنوان گاز حامل با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه مورد ا ستفاده قرار گرفت و دمای ق سمت تزریق و آ شکار ساز به ترتیب ۲۵۰ و ۳۰۰°C بود. روش آماده سازی نمونه برای تزریق به دستگاه به شرح زیر بود:

ابتدا ۱۵ میلی‌گرم پلی‌ســاکارید در داخل لوله آزمایش توزین و به آن ۲ میلی‌متر از محلول ۲ مولار اسیدتری فلورواستیک اضافه شد. سپس لوله‌ها به صورت درب بسته در دمای ۱۲۰°C به مدت ۲ ساعت حرارت دیدند. اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب ۴۰°C حذف شد و نمونه‌های هیدرولیزشده توسط ۵۰ میلی‌گرم بروهیدرید سدیم خنثی شدند. اسیدی کردن نمونه‌ها با استفاده از ا سید ا ستیک انجام شد و ا سیدبوریک ا ضافی با ا ستفاده از متانول حذف شد. آلدیتول‌های حا صله با استفاده از مخلوط پیریدین- انیدرید استیک (نسبت مخلوط) در حمام آب ۹۰°C به مدت ۱ ساعت به ا ستات‌های آلدیتول مربوطه تبدیل شدند. ا ستات‌های آلدیتول مونو ساکاریدهای ا ستاندارد (د- گلوکز، د- گالاکتوز، ال- رامنوز، د- مانوز، ال- آرابینوز، د- زایلوز و ال- گالاکتورونیک‌اســـید) همراه با ۲ میلی‌گرم میواینوزیتول (به عنوان اســتاندارد داخلی) همانند روش ذکرشــده در بالا تهیه و به دســتگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شدند (Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F. 1994., Chen et al. 2011).

۳-۴-۳-۶- هیدرولیز اسیدی ناقص

هیدرولیز اســیدی ناقص پلی‌ســاکارید محلول در آب، با اســتفاده از روش تانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد. بطور خلاصه، ۸۰ میلی‌گرم پلی‌ساکارید توسط ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ مولار اسید تری فلورواستیک در دمای ۸۰°C به مدت ۱۶ ساعت هیدرولیز شد و پلی‌ساکارید هیدرولیز شده به منظور حذف رســوبات ســانتریفوژ گردید. رســوبات جداشــده تحت عنوان پلی‌ســاکارید ۱ نام‌گذاری شدند. سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد و در انتها فراکشن جداشده جمع‌آوری و تحت عنوان پلی‌ساکارید ۴ نام‌گذاری شد. سیال باقی‌مانده در کیسه دیالیزی توسط اتانول رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عنوان پلی‌ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند.

تمامی فراکشن‌ها پس از خشک شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، همانطور که قبلا شرح داده شد آنالیز شدند (Aspinall, G., & Ferrier, R. 1957).

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

ابتدا ۲۰ میلی‌گرم پلی‌ساکارید توسط ۲۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۴ مولار پریودات سدیم[۱] اکسیده شد و پس از نگهداری در تاریکی، هر ۴ ساعت یکبار میزان جذب آن در ۲۳۳ نانومتر ثبت گردید. پایان اکسیداسیون با ثابت شدن میزان جذب پس از ۹۶ ساعت تعیین شد و پریودات سدیم مازاد با افزودن اتیلن‌گلیکول حذف گردید. مصرف پریودات و تولید اسیدفورمیک به ترتیب توسط روش اسپکتروفتومتری و تیتراسیون با محلول ۰/۰۵۳ مولار سود تعیین شد. محلول حاصل از پریودات به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد و سپس توسط ۵۰ میلی‌گرم بروهیدرید سدیم (در دمای ۲۵°C و به مدت ۱۲ ساعت) خنثی گردید. در نهایت هیدرولیز کامل توسط محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک، مانند آنالیز مونوساکاریدها، صورت گرفت و محصولات حاصله پس از استیله شدن توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند (Aspinall, G., & Ferrier, R. 1957., Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F. 1994).

۳-۴-۳-۸- متیله کردن

ابتدا ۵ میلی‌گرم پلی‌ساکارید کاملا خشک، داخل بالن ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و با استفاده از سرنگ شیشه‌ای، ۱ میلی‌لیتر DMSO به آن اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق توسط امواج فراصوت فراوری شد و مجددا با استفاده از سرنگ شیشه‌ای، ۰/۴ میلی‌لیتر محلول متیل سولفینیل متیل‌سدیم[۲] به آن افزوده گردید. ژل حاصله توسط فراوری با فراصوت در دمای ۲۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه به مایع تبدیل شد.

---

۱ - $NaIO_4$

۲ - Methylsulfinyl methyl sodium

سپس ۰/۳ میلی‌لیتر یدید متیل خشک به آن اضافه گردید و مجددا در دمای ۲۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه فرا صوت‌دهی شد. مخلوط حا صله به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار کمی آب، جهت خنثی کردن متیل سولفینیل متیل‌سدیم مازاد، به آن اضافه گردید. سو سپانسیون حا صل، به لوله‌های سانتریفوژی ۱۲ میلی‌لیتری منتقل شد. پلی ساکارید متیله شدهٔ موجود در سوسپانسیون توسط ۴ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج گردید و توسط طیف مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت. عدم مشاهده پیک جذبی در نواحی مربوط به گروه هیدروکسیل (حدود $۳۴۲۰cm^{-1}$) به عنوان پایان فرآیند متیله کردن در نظر گرفته شد.

محصولات متیله شده توسط اسید فرمیک و محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک هیدرولیز شدند و پس از حذف اسید مازاد توسط بروهیدرید سدیم خنثی گردیدند. آلدیتول‌های حاصله با ا ستفاده از مخلوط پیریدین- انیدرید ا ستیک با ن سبت ۱:۱، در حمام آب ۹۰°C به مدت ۱ ساعت به استات‌های آلدیتول مربوطه تبدیل شدند و در نهایت استات‌های آلدیتول نیمه متیله شده توسط کروماتوگرافی گازی – طیف‌سنج جرمی مورد آنالیز قرار گرفتند. کروماتوگرافی گازی – طیف‌سنج جرمی مورد ا ستفاده مجهز به ستون موئینه کوارتزی HPS (۲۵ متر × ۰/۲۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر) بود. دمای ستون در ۱۲۰°C به مدت ۲ دقیقه ثابت شد و سپس تا ۲۶۰°C (با نرخ ۱۵°C/min) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در همین دما نگهداری شد. باقی مشخصات، مشابه با کروماتوگرافی گازی مورد ا ستفاده برای شنا سایی مونو ساکاریدها بود، که در بالا شرح داده شد (Needs, P. W., & Selvendran, R. R. 1993., Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F. 1994).

۳-۴-۳-۹- طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای

طیف‌های NMR کربن-۱۳ و پروتون پلی‌ساکارید، توسط طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز برای NMR پروتون و ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز برای NMR کربن-۱۳ در دمای ۲۷ °C ثبت شدند. استاندارد مورد استفاده DSS و زمان بازداری ۲ ثانیه بود. مقداری از پلی ساکارید، در حلال بی‌اثر D_2O (۹۹/۹٪)، بصورت محلول درآمد و سپس در بین دوقطب مغناطیس دستگاه قرار گرفت. تغییرات ایجاد شده توسط دستگاه NMR، در مقاسیه با جسم استاندارد، به صورت یکسری خطوط یا پیک‌هایی با ارتفاع متفاوت، ثبت و مورد ارز شیابی قرار گرفت. جابجایی شیمیایی پیک‌ها بر حسب ppm نمایش داده شد.

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴- نتایج و بحث

۴-۱- استخراج، خالص‌سازی و شناسایی واحدهای سازنده پلی‌ساکارید

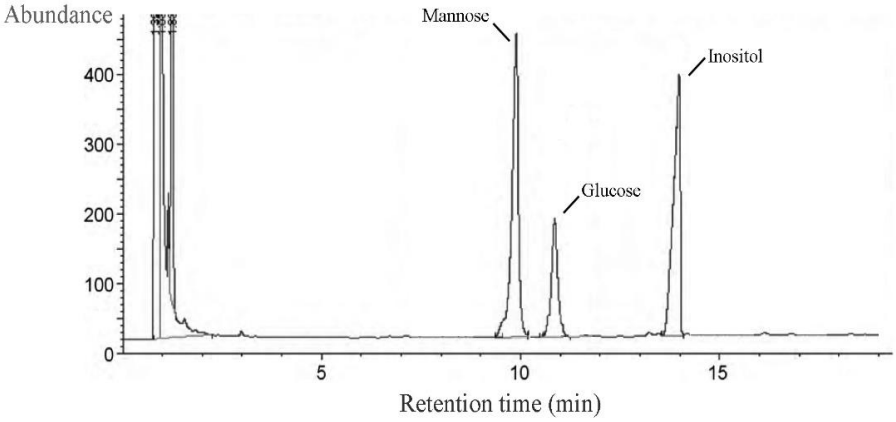
۴-۱-۱- استخراج و خالص‌سازی

پلی‌ساکارید محلول در آب ریشه گیاه سریش تماشایی با استخراج توسط آب مقطر گرم (۶۰°C)، پروتئین زدایی به روش سواگ و سپس ترسیب با اتانول جدا سازی شد و پس از شستشو، توسط تبخیر کننده دورانی تحت خلاء خشک گردید. پودر حاصل از مراحل قبل، پلی‌ساکارید ناخالص به رنگ قهوه‌ای بود که توسط ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ خالص گردید و در نهایت فراکشن غالب عبوری از ستون جمع‌آوری و خشک شد. پلی ساکارید خالص حاصل پودری سفید رنگ (شکل۴-۱) بود که برای آنالیزهای شیمیایی و دستگاهی تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت. راندمان تولید پلی ساکارید خالص از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری ۱/۴٪ محاسبه شد.

شکل ۴-۱: پلی‌ساکارید خالصِ حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری

۴-۱-۲- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید

میزان قند کل پلی ساکارید کاملا خالص ۹۷/۲٪ توسط روش فنل-اسید سولفوریک محاسبه شد که نشان‌دهنده درجه خلوص بسیار بالای پلی ساکارید و انجام خوب مراحل خالص سازی است. برای تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید، پلی ساکارید کاملا خالص توسط اسید تری فلورواستیک به واحدهای مونوساکاریدی سازنده خود هیدرولیز شد و پس از استیله شدن و تبدیل به استات‌های آلدیتول مربوطه، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. نتایج حاصله شکل ۴-۲ نشان داد که پلی ساکارید کاملا خالص از واحدهای مونوساکاریدی گلوکز و مانوز با نسبت‌های مولی ۱ به ۲/۹ تشکیل شده است. بررسی‌های انجام شده روی گونه‌های دیگر سریش مشخص کرد که نسبت مانوز به گلوکز در گونه تماشایی بیشتر از گونه‌های یایی (۲/۴: ۱)، لاکتیفلوروس (۲/۸: ۱)، آلتائیکوس (۲/۶: ۱) و کمتر از گونه‌های زانگزوریکوس (۳/۳: ۱)، لوتئوس (۳/۱: ۱)، تادشیکروم (۱:۵) و مشابه با گونه کریستاتوس (۲/۹: ۱) است (Smirnova et al, 2001., Rakhimov et al, 1983., Rakhimov et al, 1982., Dzhumamuratova et al, 1981., Igamberdieva et al, 1977).



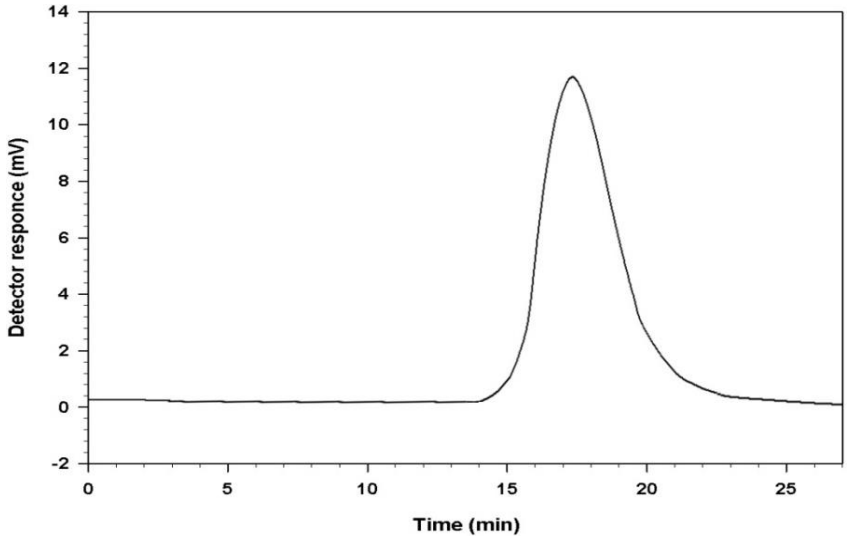
شکل ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه سریش تماشایی

۴-۲- تعیین ساختار

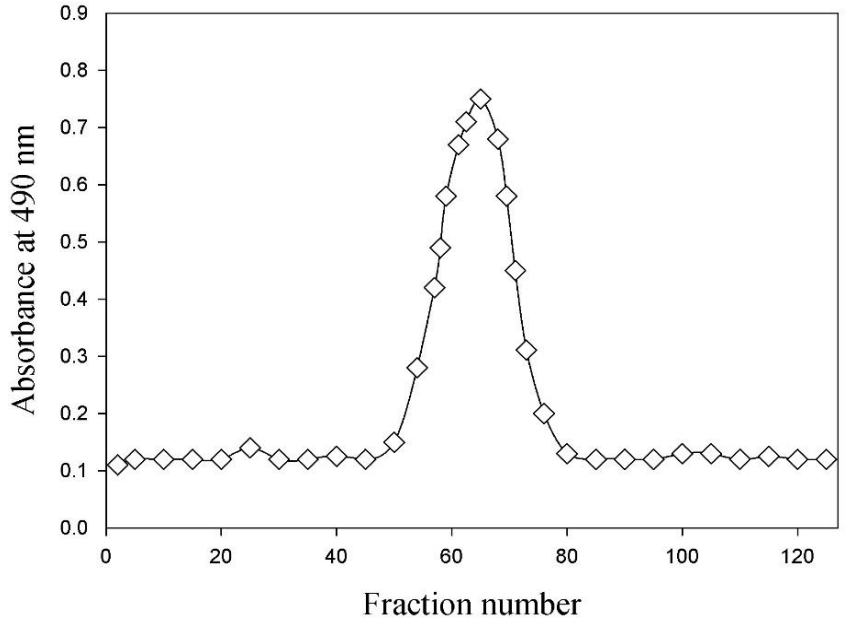
۴-۲-۱- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی‌ساکارید

همانطور که قبلا اشاره شد برای تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص از ستون سفادکس جی-۱۰۰ و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا با استفاده از استانداردهای دکستران استفاده شد. منحنی‌های حاصل از هر دو روش یک پیک تنها و متقارن را نشان داد که بیانگر همگن بودن پلی‌ساکارید است. با مقایسه منحنی‌های مربوط به پلی‌ساکارید با منحنی‌های استاندارد دکستران، میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ۴۷/۵ کیلودالتون محاسبه شد. وزن مولکولی در سایر گونه‌های سریش مانند کریستاتوس (۶۹ کیلودالتون)، تاد شیکروم (۶۳ کیلودالتون)، یایی (۲۶۵/۵ کیلودالتون)، زانگزوریکوس (۲۳۳/۵ کیلودالتون)، لاکتیفلوروس (۷۹ کیلودالتون)، لوتئوس (۱۵۰ کیلودالتون) و آلتائیکوس (۱۲۰ کیلودالتون) گزارش شده است که با مقایسه آن‌ها با گونه سریش تماشایی می‌توان نتیجه گرفت که وزن مولکولی سریش تماشایی از سایر گونه‌های گزارش شده کمتر است (Smirnova et al, 2001., Rakhimov et al, 1983., Rakhimov et al, 1982., Dzhumamuratova et al, 1981., Igamberdieva et al, 1977).

منحنی‌های مربوط به پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری بر روی کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا و ستون سفادکس جی-۱۰۰ به ترتیب در شکل‌های ۴-۳ و ۴-۴ نشان داده شده است.



شکل ۴-۳: کروماتوگرام پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری با استفاده از **HPGPC** روی ستون **TSK-GEL G3000 PWXL**



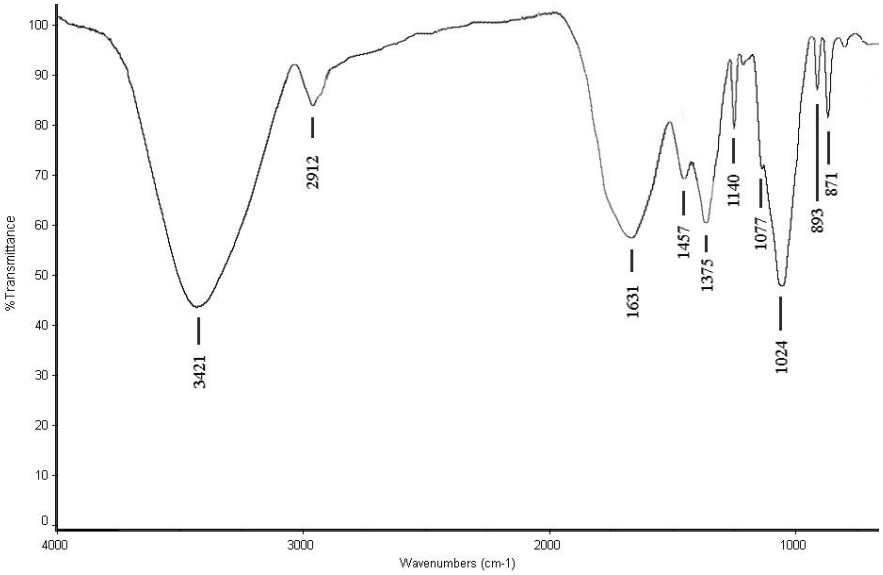
شکل ۴-۴: منحنی پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری پس از شستشو با ستون سفادکس جی-۱۰۰

۴-۲-۲- تعیین درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص $[\alpha]_D^{20}$ -۳۶/۳° محاسبه شد، که نشان‌دهنده وجود سهم بسیار زیاد اتصالات نوع β در ساختار پلی‌ساکارید خالص است. پلی‌ساکاریدهای حاصل از گونه‌های جنس سریش، اغلب دارای اتصالات β هستند، لذا درجه چرخش نوری آن‌ها در محدوده منفی و به شرح زیر است: گونه کریستاتوس با درجه چرخش ۳۶-، تادشیکروم ۳۳-، یایی ۳۴-، زانگزوریکوس ۳۸/۲-، لاکتیفلوروس ۲۱/۷- و آلتائیکوس ۳۵- است که می‌توان نتیجه گرفت اتصال غالب در گونه تماشایی مانند سایر گونه‌ها و اکثراً از نوع β است (Smirnova et al, 2001., Rakhimov et al, 1983., Rakhimov et al, 1982., Dzhumamuratova et al, 1981., Igamberdieva et al, 1977).

۴-۲-۳- طیف مادون قرمز

با توجه به شکل ۴-۵، پس از بررسی نتایج حاصل از طیف مادون قرمز، یک پیک بزرگ در ناحیه cm^{-1} (۳۴۲۱) دیده شد که مربوط به گروه‌های OH است. در ناحیه cm^{-1} (۲۹۱۲) پیک حاصل از ارتعاشات اتصال C-H به کربن‌های شماره ۶ واحدهای قندی وجود دارد. ناحیه cm^{-1} (۱۶۳۱) مربوط به اتصال با آب و جذب‌های مربوط به ارتعاشات C-H در ساختار حلقه در ناحیه cm^{-1} (۱۴۵۷) و cm^{-1} (۱۳۷۵) به صورت دو پیک کوچک مشخص شده است. وجود پیک در ناحیه cm^{-1} (۱۱۴۰) نشان‌دهنده وجود اتصالات اتری (C-O-C) در ساختار پلی‌ساکارید است. جذب در مناطق cm^{-1} (۱۰۲۴) و cm^{-1} (۱۰۷۷)، نتیجه وجود ارتعاشات کششی مربوط به اتصال الکلی (C-O-H) است وجود پیک در ناحیه cm^{-1}(۸۹۳) نشان‌دهنده وجود قند مانوز با اتصال β-D است و در نهایت وجود پیک در ناحیه cm^{-1} (۸۷۱) نشان‌دهنده وجود باند گلیکوزیدی β در ساختار زنجیره پلی‌ساکارید است. لازم به ذکر است که فقدان پیک در نواحی cm^{-1} (۱۷۴۰-۱۷۰۰) و cm^{-1} (۱۲۶۰- ۱۲۲۰) بیانگر عدم وجود گروه استیل در ساختار پلی‌ساکارید است؛ لذا پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری متمایز از سایر گونه‌های سریش می‌باشد.



شکل ۴-۵: طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری

۴-۲-۴- هیدرولیز ناقص اسیدی

چهار فراکشن ESPS-1a (رسوب پس از هیدرولیز)، ESPS-1b (رسوب در کیسه دیالیز)، ESPS-1c (سیال رویی در کیسه دیالیز) و ESPS-1d (فراکنش بیرون از کیسه دیالیز) پس از انجام هیدرولیز ناقص اسیدی از پلی‌ساکارید خالص، بازیافت و توسط اسید تری فلورواستیک هیدرولیز کامل شدند و با دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج حاصل (جدول۴-۱) نشان‌دهنده وجود مانوز و گلوکز در ESPS-1a و ESPS-1b بود و فقط مقدار کمی مانوز در ESPS-1c و ESPS-1d وجود داشت. لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مانوز و گلوکز احتمالاً مونوساکاریدهای سازنده زنجیر اصلی (اسکلت اصلی) پلی‌ساکارید هستند و مقدار جزئی مانوز نیز در شاخه جانبی پلی‌ساکارید خالص قرار گرفته است.

جدول ۴-۱: نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه سریش تماشایی

فراکشن ها	نسبت‌های مولی			
	اریتریتول	گلیسرول	مانوز	گلوکز
هیدرولیز ناقص اسیدی				
پلی‌ساکارید ۱	_____	_____	۲/۵۴	۱/۰۰
پلی‌ساکارید ۲	_____	_____	۲/۴۶	۱/۰۰
پلی‌ساکارید۳	_____	_____	۰/۴۹	_____
پلی‌ساکارید۴	_____	_____	۰/۴۷	_____
محصولات اکسیداسیون پریودات				
هیدرولیز کامل اسیدی	۷/۰۴	۱/۰۱	_____	_____
تجزیه اسمیت				
خارج از کیسه دیالیز	۶/۹۵	۰/۹۶	_____	_____
شناور در کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____
رسوب در کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____

۴-۲-۵- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت

نتایج اکسیداسیون پریودات نشان داد که ۱/۱۴ مول پریودات مصرف شد و ۰/۱۳ مول اسید فرمیک تولید گردید. این نتایج بیانگر وجود مقادیر کم اتصالات ←۱ یا (۶←۱) در ساختار پلی‌ساکارید خالص است. مقدار مصرف پریودات حدود ۹ برابر اسیدفرمیک تولید شده است که نشان می‌دهد اتصالاتی مانند (۴←۱) یا (۲←۱) به مقدار نسبتا زیاد در ساختارپلی ساکاریدهای خالص وجود دارند. آنالیز کروماتوگرافی گازی محصولات کاملاً هیدرولیز شده حاصل از پریودات (جدول۴-۱)، بیانگر عدم حضور مانوز و گلوکز و وجود مقادیر قابل توجهی اریتریتول و نیز مقداری گلیسیرول بود.

عدم حضور هیچ‌یک از واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید بیانگر این است که تمامی واحدهای مانوز و گلوکز دارای اتصالاتی نظیر ←۱، (۴←۱)، (۶←۱)، (۲←۱)، (۴،۶←۱) و (۲،۶←۱) بوده و فاقد اتصالات (۳←۱) هستند و وجود مقادیر قابل توجه اریتریتول بیانگر وجود تعداد زیاد اتصالات (۴←۱) و (۴،۶←۱) در ساختار پلی‌ساکارید خالص است.

نتایج حاصل از تجزیه اسمیت (جدول۴-۱) نشان‌دهنده عدم وجود رسوب در کیسه دیالیز بود که بیانگر اکسید شدن کامل اسکلت اصلی پلی‌ساکارید توسط پریودات است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص سریش تماشایی بختیاری دارای اتصالاتی مانند (۴→۱)، (۲→۱)، (۶→۱)، →۱، (۲،۶→۱) و (۴،۶→۱) است. وجود مقادیر زیاد اریتریتول تولید شده نشان‌دهنده وجود تعداد زیاد اتصالات (۴→۱) یا (۴،۶→۱) در ساختار اصلی پلی‌ساکارید خالص است و وجود گلیسیرول نیز احتمالاً از اتصالات →۱ که مربوط به پایانه غیر احیاء کننده (نقطه انشعاب) است، منشاء می‌گیرد.

۴-۲-۶- آنالیز متیلاسیون

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی، وجود چهار پیک متفاوت را نشان داد (جدول۴-۲). این پیک‌ها پس از شناسایی عبارت بودند از: ۶،۳،۲- تری‌متیل گلوکز، ۳،۲- دی‌متیل مانوز، ۶،۳،۲- تری‌متیل مانوز و ۶،۴،۳،۲- تترامتیل مانوز که به ترتیب با نسبت‌های مولی ۲/۱۳، ۱/۰۲، ۴/۲۱ و ۰/۹۶، در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود داشتند. نتایج حاصل از متیلاسیون، نتایج قبلی حاصل از آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی‌ساکارید خالص و نیز نتایج حاصل از هیدرولیز اسیدی ناقص و اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت را تائید کرد. این نتایج همچنین نشان داد که تمامی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید خالص دارای اشکال پیرانوزی هستند.

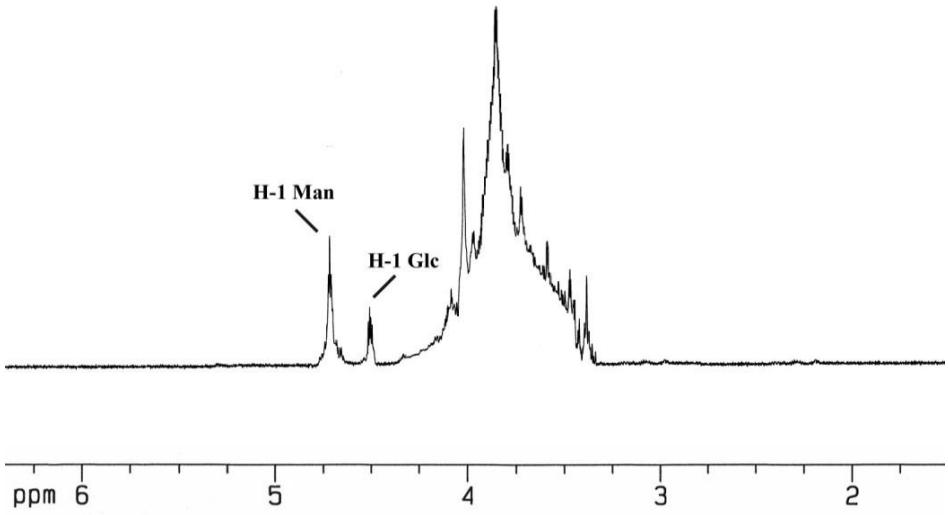
جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی آنالیز متیلاسیون پلی‌ساکارید خالص ریشه سریش تماشایی بختیاری

قند متیله شده	نسبت مولی	فراگمنت‌های جرمی(m/z)	نوع اتصال
2,3,6-Me_3-Glc	۲/۱۳	۴۳،۴۵،۷۱،۸۷،۹۹،۱۰۱،۱۱۳،۱۱۷،۱۲۹،۱۶۱،۱۷۳،۲۳۳	→4)-Glc-(1→
2,3-Me_2-Man	۱/۰۲	۴۳،۸۵،۸۷،۱۰۱،۱۱۷،۱۲۷،۱۴۲،۱۵۹،۱۶۱،۲۰۱،۲۶۱	→4,6)-Man-(1→
2,3,6-Me_3-Man	۴/۲۱	۴۳،۴۵،۷۱،۸۷،۹۹،۱۰۱،۱۱۳،۱۱۷،۱۲۹،۱۶۱،۱۷۳،۲۳۳	→4)-Man-(1→
2,3,4,6-Me_4-Man	۰/۹۶	۴۳،۴۵،۷۱،۸۷،۱۰۱،۱۱۷،۱۲۹،۱۴۵،۱۶۱،۲۰۵	Man-(1→

۴-۲-۷- طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای

۴-۲-۷-۱- طیف NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص

با توجه به شکل ۴-۶، وجود سیگنال در نواحی ۴/۷۳ ppm و ۴/۵۱ ppm به ترتیب نشان‌دهنده پروتون‌های آنومری β-D-Man*p* و β-D-Glc*p* است. وجود سیگنال شدید در ناحیه ۳/۸۱ ppm مربوط به پروتون‌های متصل به کربن‌های شماره ۴ β-D-Man*p* و وجود سیگنال در ناحیه ۳/۴۶ ppm نیز مربوط به پروتون‌های متصل به کربن‌های شماره ۴ β-D-Glc*p* است؛ لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گلوکومانان حاصل دارای پیوند غالب β(۱→۴) در زنجیره اصلی است. سیگنال در ناحیه ۴/۱۹ ppm نیز پروتون‌های متصل به کربن‌های شماره ۶ β-D-Man*p* را نشان می‌دهد، که بیانگر وجود نقطه اتصال زنجیره جانبی است. عدم مشاهده سیگنال در محدوده ۲/۲-۱/۸ ppm بیانگر عدم وجود گروه استیل در ساختار پلی‌ساکارید خالص است.



شکل ۴-۶: طیف NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص ریشه سریش تماشایی

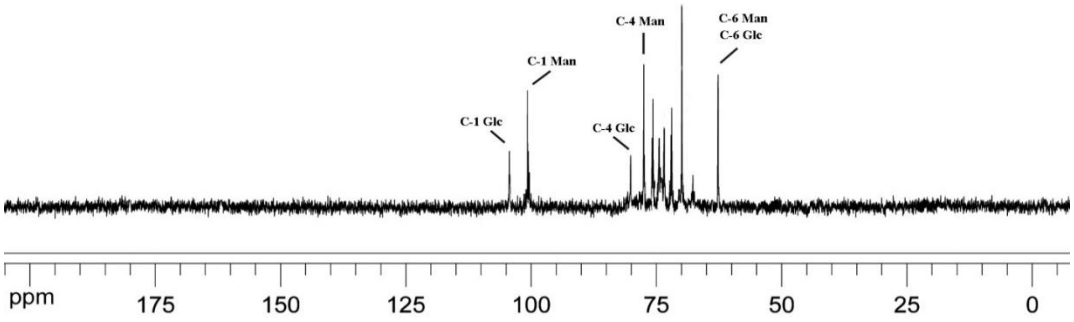
جدول ۴-۳: مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص سریش تماشایی بختیاری

واحدهای قندی	S(ppm)، جابجایی شیمیایی					
	H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6
β-D-Man*p*- (1→	۴/۷۱	۴/۰۹	۳/۶۲	۳/۶۱	۳/۴۵	۳/۹۳
→4)-β-D-Man*p*-(1→	۴/۷۳	۴/۱۳	۳/۷۵	۳/۸۱	۳/۶۱	۳/۹۸
→4,6)-β-D-Man*p*-(1→	۴/۷۲	۴/۱۱	۳/۷۶	۳/۸۰	۳/۷۳	۴/۱۹
→4)-β-D-Glc*p*-(1→	۴/۵۱	۳/۳۴	۳/۵۳	۳/۴۶	۳/۵۲	۳/۹۳

۴-۲-۷-۲- طیف کربن NMR پلی‌ساکارید خالص

با توجه به شکل ۴-۷ وجود سیگنال در نواحی ppm ۱۰۴ و ppm ۱۰۱ به ترتیب نشان‌دهنده کربن‌های آنومری β-D-Glc*p* و β-D-Man*p* است. عدم مشاهده سیگنال در محدود ppm ۶۴-۶۵ بیانگر آن است که تمام واحدهای مونو ساکاریدی تشکیل دهنده پلی ساکارید دارای اشکال پیرانوزی هستند. وجود سیگنال در نواحی ppm ۸۰ و ppm ۷۸ به‌ترتیب مربوط به کربن‌های شماره ۴ گلوکز و مانوز است که در تشکیل پیوند شرکت دارند. سیگنال در ناحیه ppm ۶۸ بیانگر کربن ۶ مانوزی است

که در تشکیل پیوند اتری شرکت کرده است. سایر سیگنال‌های کربن‌های مختلف در جدول ۴-۴ آمده است. این نتایج با نتایج حاصل از درجه چرخش نوری که نشان دهنده وجود مقادیر زیادی از اتصالات نوع β در ساختار پلی‌ساکارید بود، تطابق داشت. در محدوده ۲۲-۱۸ ppm و ۱۸۰-۱۷۰ ppm سیگنالی مشاهده نشد که می‌توان نتیجه گرفت پلی‌ساکارید فاقد استر کربوکسیل (گروه استیل) است. این نتایج همراه با نتایج H-NMR در تطابق با نتایج حاصـــل از طیف مادون قرمز نمونه بود، لذا با اطمینان می‌توان اظهار کرد پلی‌ساکارید حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی از نوع استیله نیست.

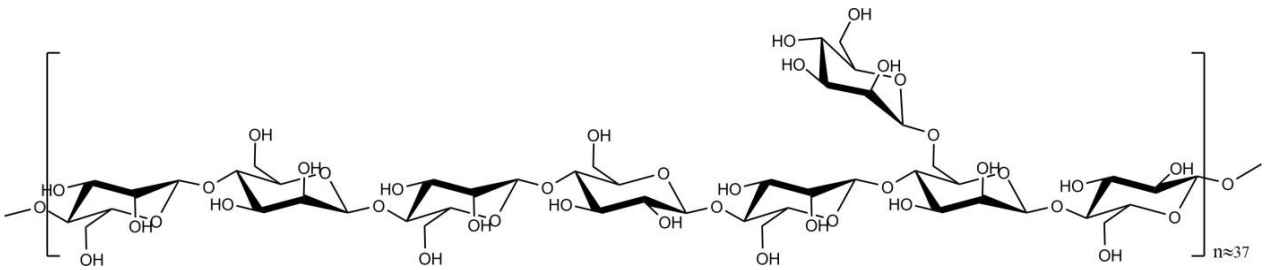


شکل ۴-۷: طیف NMR کربن-۱۳ پلی‌ساکارید خالص

جدول ۴-۴: طیف C-NMR پلی‌ساکارید خالص سریش تماشایی بختیاری

واحدهای قندی	δ (ppm) ،جابجایی شیمیایی					
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
β-(D)- Man*p*(1→	۱۰۱/۵	۷۲/۱	۷۴/۲	۶۸/۳	۷۸/۰	۶۲/۱
→4)-β-(D)- Man*p*(1	۱۰۱/۶	۷۱/۳	۷۳/۱	۷۸/۰	۷۶/۶	۶۲/۱
→4,6)-β-(D)-Man*p*(1	۱۰۱/۴	۷۰/۶	۷۳/۰	۷۸/۰	۷۵/۲	۶۸/۲
→4)-β-(D)-Glc*p*(1→	۱۰۴/۱	۷۴/۳	۷۶/۹	۸۰/۲	۷۵/۸	۶۲/۰

با تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از طیف‌سنج مادون قرمز، تعیین واحدهای مونوساکاریدهای سازنده، هیدرولیز اسیدی ناقص، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، آنالیز متیله کردن همراه با نتایج حاصل از طیف سنج NMR، ساختار پیشنهادی برای پلی‌ساکارید خالص استحصال شده از ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری به شرح شکل ۴-۸ می‌باشد.



شکل ۴-۸: ساختار پیشنهادی پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه‌های گیاه سریش تماشایی بختیاری

پس از بررسی‌های انجام شده و مقایسهٔ بین گونه سریش تماشایی بختیاری با سایر گونه‌های مورد مطالعه مشخص شد که پلی ساکارید به دست آمده از ریشه گونه تماشایی بختیاری یک گلوکومانان منشعب است که شاخه فرعی بر روی اتم کربن شماره ۶ مانوز قرار می‌گیرد. در حالی که ساختار گلوکومانان گونه‌های دیگر خطی و یا بسیار کم شاخه هستند. همچنین گلوکومانان سریش تماشایی به دلیل نداشتن گروه استیل در ساختار، از سایر گونه‌های مطالعه شده متمایز است. پیوندهای بین مونوساکاریدی در تمام گونه‌ها (۴←۱) و از نظر موقعیت کنفورماسیونی β هستند.

نتیجه گیری کلی:

پلی‌ساکارید محلول در آب ریشه گیاه سریش تماشایی بختیاری توسط استخراج با توسط آب گرم، پروتئین زدایی و سپس ترسیب با اتانول جداسازی شد و پس از شستشو، توسط تبخیر کننده دورانی تحت خلاء خشک گردید. خالص‌سازی پودر حاصل شده توسط ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد و در نهایت فراکشن غالب جمع‌آوری و خشک شد. پلی‌ساکارید خالص حاصلِ، پودری سفید رنگ بود که جهت آنالیزهای شیمیایی و دستگاهی تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیزهای شیمیایی و دستگاهی نشان داد پلی‌ساکارید ریشه گیاه سریش تماشایی یک گلوکومانان منشعب با واحدهای مونوساکاریدی گلوکز و مانوز است؛ بطوریکه واحدهای مانوز، سازنده شاخه اصلی و فرعی و مونوساکارید غالب ساختار است و واحدهای گلوکز تنها در شاخه اصلی وجود دارند. با توجه به کاربرد گستردهٔ گلوکومانان‌ها در صنایع مختلف، گلوکومانان حاصل از ریشه گیاه سریش تماشایی نیز می‌تواند به عنوان یک منبع جدید جهت استفاده در صنایع مربوطه مورد استفاده قرار گیرد، لذا مطالعات تکمیلی جهت کاربرد این گلوکومانان در صنایع مختلف از جمله صنعت غذا به عنوان قوام دهنده، امولسیفایر و افزودنی، صنعت دارویی و بهداشتی به عنوان مواد پوششی در قرص‌ها، میکروکپسول‌ها و استفاده در شربت‌های دارویی می‌تواند صورت گیرد.

منابع

حاجبی، گ .1355 . **"بررسی و مقایسه چسب سریش با سایر چسبها در تهیه قرص"**، پایان نامه دکتری، دانشگاه تهران.

دشتی، م.، توکلی ح.، ظریف کتابی، ح .و پاریاب، ا .1384 . **"مطالعه نیازهای بوم شناختی گیاه سریش (*Eremurus spectabilis M.B*) در استان خراسان"**. تحقیقات مرتع و بیابان ایران، 12: 153 -165

Aspinall, G., & Ferrier, R. (1957). "A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates". **Chemical Industry (London),** 7, 1216-1221.

Berdikeev, A., Rakhimov, D. A., Plekhanova, N. V., & Kondratenko, E. S. (1982). "Glucomannan of the tuberous roots of *Eremurus cristatus*". **Kim. Prir. Soedin**, 2, 240-247.

Brayan, C. (1989). "**Bulbs**", Timber press, Portland, Oregon.

Brickell, C. (1996). "**Encyclopedia of garden plants**", Dorling Kindersley limited, London.

Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F. (1994). "**Carbohydr. Analysis**: **A Practical Approach**". New York: Oxford University Press.

Cheng, H., Feng, S., Shen, S., Zhang, L., Yang, R., Zhou, Y., & Ding, C. (2013). "Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of Epimedium acuminatum Franch. Polysaccharide". **Carbohydr. Polymers**, 96(1), 101-108.

Chen, X., Jin, J., Tang, J., Wang, Z., Wang, J., Jin, L., & Lu, J. (2011). "Extraction, purification, characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the root of Ophiopogon japonicus". **Carbohydr. Polymers**, 83(2), 749-754.

Crockett, J. U. (1972). "**The Time-Life encyclopedia of gardening**", Time-Life Books, USA.

Cui, G., Zhang, W., Wang, Q., Zhang, A., Mu, H., Bai, H., & Duan, J. (2014). "Extraction optimization, characterization and immunity activity of polysaccharides from Fructus Jujubae". **Carbohydr. Polymers**, 111, 245-255.

Cui, S. W. (Ed.). (2005). "**Food carbohydrates: chemistry, physical properties and applications**". CRC Press.

Dong, Q., Yao, J., & Fang, J. N. (2003). "Structural characterization of the water-extractable polysaccharides from Sophora subprostrata roots". **Carbohydr. Polymers**, 54(1), 13-19.

Duan, J., Wang, X., Dong, Q., Fang, J. N., & Li, X. (2003). "Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of Diospyros kaki". **Carbohydr. Res**, 338(12), 1291-1297.

Dumitriu, S. (Ed.). (2004). "**Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**". CRC press.

Dzhumamuratova, A., Rakhimov, D. A., Shashkov, S. S., & Kondratenko, E. S. (1981). "Study of the structure of the partially acetylated Glucomannans by C^{13}-NMR method". **Khim. Prir. Soedin,** 1, 14-18.

Eliasson, A. C. (Ed.). (2006). "**Carbohydrates in food**", (Vol. 159). CRC press.

Gudyushkina, O. G., Rakhimov, D. A., & Ismailov, Z. F. (1976). "A study of the polysaccharides of *Eremurus robotus*". **Khim. Prir. Soedin**, 5, 650-651.

Guo, Q., Cui, S. W., Kang, J., Ding, H., Wang, Q., & Wang, C. (2015). "Non-starch polysaccharides from American ginseng: physicochemical investigation and structural characterization". **Food Hydrocolloids**, 44, 320-327.

He, Z., Liang, F., Zhang, Y., & Pan, Y. (2014). "Water-soluble polysaccharides from finger citron fruits (Citrus medica L. var. sarcodactylis) ". **Carbohydr. Res**, 388, 100-104.

Hu, C., Kong, Q., Yang, D., & Pan, Y. (2010). "Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from Eremurus anisopterus (Ker. et Kir) Regel roots". **Carbohydr. Polymers**, 84(1), 402-406.

Hu, H., Liang, H., & Wu, Y. (2015). "Isolation, purification and structural

characterization of polysaccharide from Acanthopanax brachypus". **Carbohydr. Polymers**, 127, 94-100.

Igamberdieva, M. I., Rakhimov, D. A., & Ismailov, Z. F. (1977). "The structure of the Glucomannan from the tuberous roots of *Eremurus altaicus*". **Khim. Prir. Soedin**, 2, 189-195.

Ke, M., Zhang, X. J., Han, Z. H., Yu, H. Y., Lin, Y., Zhang, W. G., Sun, F. H., & Wang, T. J. (2011). "Extraction, purification of Lycium barbarum polysaccharides and bioactivity of purified fraction". **Carbohydr. Polymers**, 86(1), 136-141.

Li, F., Yuan, Q., & Rashid, F. (2009). "Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from Crataegus pinnatifida Bge". **Carbohydr. Polymers**, 78(1), 80-88.

Li, J., Fan, L., & Ding, S. (2011). "Isolation, purification and structure of a new water-soluble polysaccharide from Zizyphus jujuba cv. Jinsixiaozao". **Carbohydr. Polymers**, 83(2), 477-482.

Liang, B., Jin, M., & Liu, H. (2011). "Water-soluble polysaccharide from dried Lycium barbarum fruits: Isolation, structural features and antioxidant activity". **Carbohydr. Polymers**, 83(4), 1947-1951.

Luo, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., Luo, A., & Chun, Z. (2010). "Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from Dendrobium nobile Lindl". **Carbohydr. Polymers**, 79(4), 1014-1019.

Luo, D. (2008). "Identification of structure and antioxidant activity of a fraction of polysaccharide purified from Dioscorea nipponica Makino". **Carbohydr. Polymers**, 71(4), 544-549.

Ma, G., Yang, W., Mariga, A, M., Fang, Y., Ma, N., Pei, F., & Hu, Q. (2014). "Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from Pleurotus eryngii residue". **Carbohydr. Polymers**, 114, 297-305.

Mengyong, Z., Caijiao, W., Yong, G., Changsheng, H., Xiao, T., Ping, Z., & Ning, L. (2009). "Extraction, characterization of polysaccharides from Morinda officinalis and its

antioxidant activities". **Carbohydr. Polymers**, 78(3), 497-501.

Muralikrishna, G., & Rao, M. V. S. S. T. S. (2007). "Cereal Non-Cellulosic polysaccharide: Structure and Function Relationship- an Overview". **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47(6), 599-610.

Nielsen, S. S. (2010). "**Food Analysis**". Fourth Ethition. Springer Verlag.

Rakhimov, D. A., & Yuldasheva, N. P (1996). "Polysaccharides of *Eremurus*.XXIX. Isolation of a glucomannan". **Kim. Prir. Soedin**, 4, 606-608.

Rakhimov, D. A., & Kondratenko, E. S. (1983). "A Glucomannan of the tuberous roots of Eremurus tadshicorum". **Khim. Prir. Soedin**, 3, 382-383.

Rakhimov, D. A., Igamberdieva, M. I. & Ismailov, Z. F. (1976). "Structure of the Glucomannan from Eremurus turkestanicus". **Khim. Prir. Soedin**, 1, 130-131.

Rubin, R. (2002). "**The Melagria: on anchorites and edible roots in Judaean Desert**". Liber Annuus, 52, 347-352.

Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., & Iacomini, M. (2015). "D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches". **Carbohydr. Polymers,** 117, 753-761.

Shakhmatov, E. G., Toukach, P. V., Kuznetsov, S. P., & Makarova, E. N. (2014). "Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from Heracleum sosnowskyi Manden". **Carbohydr. Polymers**, 102, 521-528.

Smirnova, N. I., Mestechkina, N. M., & Shcherbukhin. (2001). "The structure and Characteristics of Glucomannans from *Eremurus iae* and Eremurus *zangezuricus:* Assigment of acetyl group localization in macromolecules". **Priklandnaya Biokhimiya Mikrobiologiya**, 37 (3), 332-337.

Song, E, H., Shang, J., & Ratner, D, M. (2012). "**Polymer Science: A Comprehensive Reference**", (Vol 9). University of Washington, Seattle, WA, USA.

Stephen, A. M., & Phillips, G. O. (Eds.). (2006). "**Food polysaccharides and their applications**", (Vol. 160). CRC Press.

Sun, L., Feng, K., Jiang, R., Chen, J., Zhao, Y., Ma, R., & Tong, H. (2010). "Water-

soluble polysaccharide from Bupleurum chinense DC: Isolation, structural features and antioxidant activity". **Carbohydr. Polymers**, 79(1), 180-183

Thangam, R., Suresh, V., & Kannan, S. (2014). "Optimized extraction of polysaccharides from Cymbopogon citratus and its biological activities". **International journal of biological macromolecules,** 65, 415-423.

Tsai, C. S. (2007). "**Biomacromolecules: Introduction to structure, function and informatics**". John Wiley & Sons.

Walter, R. H. (1997). "**Polysaccharide dispersions: chemistry and technology in food".** Academic Press.

Whistler, R. L. (1965). **Methods in carbohydrate chemistry**: **General polysaccharides**. Academic Press, New York. Volume 5.

Wrolstad, R. E. (2012). "**Food carbohydrate chemistry**", (Vol. 48). John Wiley & Sons.

Wu, D. T., Meng, L. Z., Wang, L. Y., Lv, G. P., Cheong, K. L., Hu, D. J., Guan, J., Zhao, J., & Li, S. P. (2014). "Chain conformation and immunomodulatory activity of a hyperbranched polysaccharide from Cordyceps sinensis". **Carbohydr. Polymers**, 110, 405-414.

Wu, M., Wu, Y., Zhou, J., & Pan, Y. (2009). "Structural characterisation of a water-soluble polysaccharide with high branches from the leaves of Taxus chinensis var. mairei". **Food Chemistry,** 113(4), 1020-1024.

Xie, J. H., Xie, M. Y., Nie, S. P., Shen, M. Y., Wang, Y. X., & Li, C. (2010). "Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja". **Food Chemistry**, 119(4), 1626-1632.

Xie, X., Wang, J., & Zhang, H. (2015). "Characterization and antitumor activities of a water-soluble polysaccharide from Ampelopsis megalophylla". **Carbohydr. Polymers**, *129*, 55-61.

Xin, T., Zhang, F., Jiang, Q., Chen, C., Huang, D., Li, Y., & Jin, Y. (2012). "Extraction, purification and antitumor activity of a water-soluble polysaccharide from the roots of Polygala tenuifolia". **Carbohydr. Polymers**, 90(2), 1127-1131.

Yildiz, F. (Ed.). (2009). “**Advances in food biochemistry**”. CRC press.

Zhang, X., Yu, L., Bi, H., Li, X., Ni, W., Han, H., Li, N., Wang, B., Zhou, y., & Tai, G. (2009). “Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from Panax ginseng CA Meyer”. **Carbohydr. Polymers**, 77(3), 544-552.

Yin, Y., Yu, R., Yang, W., Yuan, F., Yan, C., & Song, L. (2010). “Structural characterization and anti-tumor activity of a novel heteropolysaccharide isolated from Taxus yunnanensis”. **Carbohydr. Polymers**, 82(3), 543-548.

Yu, R., Yin, Y., Yang, W., Ma, W., Yang, L., Chen, X., & Song, L. (2009). “Structural elucidation and biological activity of a novel polysaccharide by alkaline extraction from cultured Cordyceps militaris”. **Carbohydr. Polymers**, 75(1), 166-171.

Zha, S., Zhao, Q., Chen, J., Wang, L., Zhang, G., Zhang, H., & Zhao, B. (2014). “Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (Lepidium meyenii)”. **Carbohydr. Polymers**, 111, 584-587.

Zhang, A. Q., Xiao, N. N., Deng, Y. L., He, P. F., & Sun, P. L. (2012). “Purification and structural investigation of a water-soluble polysaccharide from Flammulina velutipes”. **Carbohydr. Polymers**, 87(3), 2279-2283.

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.

Zhao, G., Kan, J., Li, Z., & Chen, Z. (2005). “Structural features and immunological activity of a polysaccharide from Dioscorea opposita Thunb roots”. **Carbohydr. Polymers**, 61(2), 125-131.

Abstract

The *Eremurus* plant, popularly called “serish” in Iran, belongs to the Liliaceae family. *Eremurus spectabilis* is one of the most important species from this genus. It grows very well in South and Central Asia, including Iran, West Pakistan, Afghanistan, Iraq, Turkey, Palestine, Lebanon, Syria and Caucasus. In current study a water-soluble crude polysaccharide (CESP) with molecular weight of 47.5 KDa was obtained from the roots of *E. spectabilis* by warm-water extraction (60°C), ethanol precipitation and deproteinization. CESP was purified with DEAE-cellulose A52 column and the main fraction was collected, vacuum-dried. The total yield of purified polysaccharide was 4.1% of the dried material. Total carbohydrate content and Specific optical rotation of polysaccharide were 97.2% and 36.6° respectively. Monosaccharide analysis showed that polysaccharide was composed of Glucose and Mannose with a relative molar ratio of 1.0: 2.9. Its structural features were elucidated by a combination of chemical and analytical methods such as methylation, Gc-Ms analysis, Periodate Oxidation and Smith degradation, Partial acid hydrolysis, FT-IR and ^{13}C and ^{1}H NMR Spectroscopy. The data obtained indicate that purified polysaccharide from E.spectabilis roots possessed a backbone of β-(1→4)-linked Glucose and Mannose with branched attached to O-6 by β-1→linked Mannose.

Key word: Polysaccharide, Extraction and Purification, Eremurus Spectabilis, Structural Characterization

University of Shahrood

Faculity of agriculture

Department of Horticulture and Food Science

Extraction, purification and structural characterization of a main water-soluble polysaccharide *from Eremurus spectabilis M.B. subsp. Spectabili* roots

Masoumeh Beigi

Superviser:

Dr. Kambiz Jahanbin

September (2015)