بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده مهندسی کشاورزی

گروه علوم و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه‌های گیاه چوبک نکائی (کرک غده ای)

محمد ملاویسی

استاد راهنما :

دکتر کامبیز جهان بین

شهریور ۱۳۹۴

دانشگاه شاهرود

دانشکده : مهندسی کشاورزی

گروه : علوم و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای/ خانم .....محمد ملاویسی.... به شماره دانشجویی: ۹۲۴۰۱۷۴

تحت عنوان: بررسی ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه‌های گیاه چوبک نکائی (کرک غده ای)

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 : دکتر کامبیز جهان بین		نام و نام خانوادگی :	
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 به

پدرم

به پاس آنچه در توصیف زحماتش ناگفته خواهد ماند،

مادرم

که دیدگان پر از عشقش، ثانیه‌های زندگیم را دنبال می‌کند،

به همسرم

با تو همه چیز متفاوت است، زیبا و پرشور، زندگی در برابر تو، تنها می تواند نیک باشد

و تقدیم به تمامی جویندگان علم و دانش

سپاس پروردگار مهربانی را که به بندگانش هنر آموختن بخشید و سپاس از همه آن هایی که به من آموختند و امکان آموختنم را فراهم نمودند. اکنون که به یاری پروردگار مهربان مراحل انجام این تحقیق به پایان رسیده است، سپاسگزار همه اساتید و بزرگوارانی هستم که از راهنمایی هایشان بهره جسته ام.

- جناب آقای دکتر کامبیز جهان بین

- جناب آقای دکتر احمد رجایی

- جناب آقای دکتر حمید صمد لویی

- جناب آقای دکتر حکیمی تبار

- جناب آقای حسینی کارشناس آزمایشگاه که در کمک به انجام برخی آزمایشات دلسوزی و تلاش فراوان داشتند.

- سرکار خانم بیگی، به طور ویژه سپاسگزاری می شود

چکیده:

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی با وزن مولکولی ۳۵/۲ کیلو دالتون و درجه چرخش نوری $+۱۷۸/۵^{\circ}$ توسط استخراج با آب گرم (۵۰°C) از ریشه های گیاه چوبک نکائی استخراج شد. خالص سازی پلی ساکارید توسط ستون های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ انجام گرفت. راندمان استخراج پلی ساکارید ناخالص و خالص به ترتیب ۳/۴۵٪ و ۲/۳۸٪ بود. پلی ساکارید خالص جذبی در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش نداشت و مقدار قند کل آن ۹۸/۲٪ بود. نتایج آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید با دستگاه کروماتوگرافی گازی نشان داد که پلی ساکارید ریشه های گیاه چوبک نکائی از واحدهای مونومری گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز و مانوز به ترتیب با نسبت های مولی ۲/۹، ۶/۱، ۰/۹ و ۱ تشکیل شده است. شناسایی ساختار پلی ساکارید توسط تلفیقی از روشهای شیمیایی و دستگاهی مانند متیلاسیون، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، طیف مادون قرمز و طیف رزونانس مغناطیس هسته اتم های کربن و پروتون صورت گرفت و نتایج حاصل نشان داد واحدهای گالاکتوز با اتصالات (۶→۱) α اسکلت اصلی ساختاری پلی ساکارید خالص را تشکیل می‌دهند. واحدهای گالاکتوز در نقاطی از زنجیره اصلی از محل کربن های شماره ۲ و ۳ خود دارای انشعاب بوده و شاخه ها توسط واحدهای مونوساکاریدی گلوکز، آرابینوز و مانوز به انتها می‌رسند.

کلمات کلیدی: چوبک نکائی، پلی ساکارید، تعیین ساختار، استخراج و خالص سازی

فهرست **شماره صفحه**

چکیده: ..... و

فصل اول ۱

کلیات ۱

مقدمه: ۲

۱-۱- پلی ساکاریدها ۳

۱-۱-۱- تعریف ۳

۱-۱-۳- انحلال در آب ۶

۱-۱-۴- خالص سازی ۶

۱-۱-۴-۱- آماده سازی نمونه ۹

۱-۱-۴-۲- شرایط استخراج ۹

۱-۱-۴-۳- انتخاب حلال ۱۰

۱-۱-۴-۴- روش های استخراج ۱۰

۱-۱-۵- خالص سازی ۱۱

۱-۱-۵-۱- حذف پروتئین ها ۱۲

۱-۱-۵-۱-۱- حذف پروتئین ها توسط روش سواگ ۱۳

۱-۱-۵-۲- حذف سایر ناخالصی ها ۱۳

۱-۱-۶-ترسیب پلی ساکاریدها ۱۵

۱-۱-۷- شناخت و تشخیص ساختمان شیمیایی مولکولی ۱۶

۱-۱-۷-۱- روش های شیمیایی ۱۷

۱-۱-۷-۱-۱- تعیین وزن مولکولی ۱۷

۱-۱-۷-۱-۲- تعیین مونوساکاریدهای سازنده ۱۸

۱-۱-۷-۱-۲-۱-کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۱۹

۱-۱-۷-۱-۲-۲- کروماتوگرافی گازی ۲۱

۱-۱-۷-۱-۳- تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی ۲۳
۱-۱-۷-۱-۳-۱- متیله کردن ۲۳
۱-۱-۷-۱-۳-۲- هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص) ۲۴
۱-۱-۷-۱-۳-۳- اکسایش ۲۵
۱-۱-۷-۲- روشهای آنزیمی ۲۶
۱-۱-۷-۳- روش های طیف سنجی ۲۷
۱-۱-۷-۳-۱- درجه چرخش نوری (پلاریمتری) ۲۷
۱-۱-۷-۳-۲- طیف سنج فرابنفش و مرئی ۲۷
۱-۱-۷-۳-۳- طیف سنجی مادون قرمز ۲۸
۱-۱-۷-۳-۴- طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای ۲۸
۱-۱-۷-۳-۵- طیف سنجی جرمی ۳۰
۱-۲- گیاه چوبک ۳۱
۱-۲-۱- مقدمه ۳۱
۱-۲-۲- خصوصیات اکولوژیکی و تاکسونومی گیاه ۳۲
۱-۲-۳- مشخصات ظاهری گیاه ۳۲
۱-۲-۴- ترکیبات شیمیایی ۳۴
۱-۲-۵- موارد مصرف و کاربردهای چوبک ۳۵
فصل دوم ۳۷
۲-۱- استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها ۳۸
۲-۲- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها ۴۲
فصل سوم ۴۹
مواد و روش ها ۴۹
۳-۱- مواد اولیه و محلول های شیمیایی ۵۰
۳-۱-۱- جمع آوری ریشه گیاه چوبک نکائی ۵۰
۳-۱-۲- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده ۵۰

۳-۲- دستگاه های مورد استفاده ۵۰
۳-۳- روش کار ۵۱
۳-۳-۱- استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه های گیاه چوبک نکائی ۵۱
۳-۳-۱-۱- حذف مواد چربی دوست ۵۱
۳-۳-۱-۲- استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از نمونه ۵۱
۳-۳-۱-۳- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب ۵۲
۳-۳-۲- خالص سازی پلی ساکاریدها ۵۲
۳-۳-۲-۱- خالص سازی پلی ساکاریدهای محلول در آب ۵۲
۳-۳-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب چوبک نکائی ۵۳
۳-۳-۳-۱- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید ۵۳
۳-۳-۳-۲- طیف سنج مادون قرمز ۵۴
۳-۳-۳-۳- تعیین درجه چرخش نوری ۵۴
۳-۳-۳-۴- جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش ۵۵
۳-۳-۳-۵- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید ۵۵
۳-۳-۳-۶- هیدرولیز اسیدی ناقص ۵۶
۳-۳-۳-۷- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت ۵۶
۳-۳-۳-۸- متیله کردن ۵۷
۳-۳-۳-۹- طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای ۵۷
فصل چهارم ۵۹
۴-۱- استخراج و خالص سازی پلی ساکارید ۶۰
۴-۱-۱- استخراج و خالص سازی ۶۰
۴-۲- شناسایی ساختار پلی ساکارید ۶۰
۴-۲-۱- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید ۶۰
۴-۲-۲- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ۶۲

۴-۲-۳- تعیین درجه چرخش نوری ۶۳
۴-۲-۴- طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص ۶۳
۴-۲-۵- هیدرولیز ناقص اسیدی ۶۴
۴-۲-۶- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت ۶۵
۴-۲-۷- متیله کردن ۶۶
۴-۲-۸- طیف NMR نمونه خالص ۶۸
نتیجه گیری: ۷۱
منابع: ۷۲

فهرست اشکال **شماره صفحه**

شکل ۱-۱: اشکال قایق (الف) و صندلی (ب) قندها. ۳

شکل ۱-۲: ساختار دو نوعی پلی ساکارید ۱) منشعب ۲) خطی. ۵

شکل ۱-۳- یکی از روش های مرسوم در استخراج پلی ساکاریدها ۸

شکل ۱-۴: دستگاه تبخیر کننده تحت خلا. بالن حاوی محلول پلی ساکاریدی (۱)، مخزن آب گرم (۲)، موتور (۳)، تقطیر کننده یا کندانسور (۴)، بالن جمع آوری مواد تقطیر شده (۵). ۱۲

شکل ۱-۵: جداسازی اجزای تشکیل دهنده پنتوزان محلول در آب گندم (آرابینوزیلان و آرابینو گالاکتان ها-پپتید) توسط کروماتوگرافی ژل تراوا روی سفارز CL-4B. میزان جذب در ۴۸۰ و ۶۵۰ نانومتر به ترتیب مطابق با کربوهیدراتها (دایره) و پروتئین ها (مثلث) است. ۱۵

شکل ۱-۶: نمایش ترسیمی یک سیستم کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا. ۲۱

شکل ۱-۷- اصلاح D-گالاکتوز و نمک سدیم D-گالاکتورونیک اسید در آماده سازی برای کروماتوگرافی گازی. ۲۲

شکل ۱-۸: نمایش طرح کلی یک سیستم کروماتوگرافی گازی ۲۳

شکل ۱-۹: نحوه عمل هیدرولازها و لیازها بر روی مناطق اتصال. ۲۶

شکل ۱-۱۰: نمایی ظاهری اندام های هوایی چوبک نکائی به همراه گل آن. ۳۴

شکل۲-۱: ساختار گونه چوبک خراسانی را ارائه می کند. ۴۷

شکل۲-۲: ساختار گونه چوبک افغانستانی را نشان می دهد. ۴۷

شکل۲-۳: ساختار گونه چوبک تماشایی را ارائه می کند. ۴۸

شکل ۴-۱- پلی ساکاریدهای کاملا خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی ۶۰

شکل ۴-۲ - طیف کروماتوگرام گازی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص ۶۱

شکل ۴-۳: کروماتوگرام پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی با استفاده از HPGPC روی ستون TSK-GEL G 3000 PWXL ۶۲

شکل ۴-۴: منحنی فراکشن های پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی با استفاده از ستون سفادکس جی-۱۰۰ ..... ۶۳

شکل ۴-۵: طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی. ۶۴
شکل ۴-۶: طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص. ۷۰
شکل ۴-۷: طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص. ۷۰
شکل ۴-۸: ساختار پیشنهادی برای پلی ساکارید استخراج شده از ریشه گیاه چوبک نکائی..... ۷۱

فهرست جداول **شماره صفحه**

جدول ۴-۱: نتایج GC مربوط به هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های چوبک نکائی ۶۵

جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی مربوط به هیدرولیز اسیدی ناقص، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی. ۶۶

جدول۴-۳: نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص چوبک نکائی متیله شده. ۶۷

جدول ۴-۴: مقادیر جابجایی شیمیایی NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص چوبک نکائی. ۶۹

فصل اول

کلیات

مقدمه:

گیاهان دارویی به گیاهانی گفته می شود که یک یا برخی از اندام‌های آنها دارای ماده تاثیر گذار است. مواد موثره حتی به مقدار ناچیز می توانند خواص دارویی مفیدی بر موجودات زنده بگذارند. مراحل مختلف کاشت، داشت و برداشت این گیاهان به منظور دستیابی به مواد موثره توسط روش های اختصاصی صورت می گیرد. نحوه استخراج و خالص سازی ترکیبات موثره گیاهان دارویی اهمیت بسزایی در تاثیر گذاری آنها دارد و در صورتیکه نحوه استخراج و خالص سازی گیاهان دارویی و تحویل آنها به مردم به صورت صحیح انجام نشود خواص درمانی گیاه کاهش یافته یا از بین می رود و سبب عدم تأثیر گذاری صحیح گیاه مورد نظر در درمان بیماری می شود.

استفاده از گیاهان داروئی در ایران و ممالک شرق سابقه چند هزار ساله دارد. در سالهای اخیر به علت زیانهای داروهای شیمیایی و اثرات جانبی آنها، مجددا استفاده از گیاهان داروئی در کشورهای اروپایی و آمریکا شروع شده و بشدت رو به افزایش می باشد. هرچند که استفاده از گیاهان داروئی در عرض ۲ قرن گذشته اهمیت خود را در اروپا و کشورهای مغرب زمین از دست داد. هم اکنون گیاهان داروئی در این کشورها که از ممالک شرقی وارد شده در مقایسه با داروهای شیمیایی به قیمت های بسیار بالا عرضه می شوند. در کنار گیاهان داروئی، در عرصه مراتع ایران گیاهانی در حال رشد هستند که دارای بهای بسیار بالایی از نظر صنعتی می باشند و سالیان متمادی است که اهالی آنها را جمع آوری کرده و عمدتا به خارج از کشور صادر می کنند. با توجه به نیاز های بازار جهانی و با وجود قدرت بالقوه افزایش تولید و بهره برداری از این گیاهان داروئی و صنعتی می توان این گونه بهره برداریها را نه صرفا در حالتهای سنتی، بلکه در مقیاس های وسیع تر در بخش های داخلی یا به عنوان صادرات استفاده نمود. هم اکنون موسسات زیادی در این زمینه ها در حال فعالیت هستند. (۸).

پلی ساکاریدها از جمله ترکیبات موثری هستند که نقش بسزایی در صنایع مختلف مانند صنایع مواد غذایی، داروئی، آرایشی و بهداشتی، شیلات و ... و نیز در درمان بیماریهای مختلف انسان ها و جانوران ایفا می کنند. گیاهان از منابع مهم حاوی این ترکیبات هستند که نسبت به منابع شیمیایی به علت مضراتی که ذکر شد از اولویت بسیار بالاتری برخوردارند. با توجه به اینکه برداشت بی رویه یک گونه گیاهی جهت استحصال ترکیبات موثره آن انقراض آن گونه را در پی دارد لذا معرفی منابع جدیدی از گیاهان که حاوی ترکیبات موثره سودمند باشند از درجه ارزش بالایی برخوردار است. از این رو در پژوهش پیش رو سعی شده است که با بررسی پلی ساکاریدهای موجود در گونه چوبک نکائی و شناسایی آنها گامی سودمند برای نیل به این هدف برداشته شده و منبع جدیدی از پلی ساکاریدها جهت استفاده در صنایع مختلف و نیز پژوهش های آتی معرفی شود.

۱-۱- پلی‌ساکاریدها

۱-۱-۱- تعریف

پلی‌ساکاریدها پلیمرهایی با بیش از ۲۰ واحد مونوساکاریدی هستند و به دو گروه پلی‌ساکاریدهای نشاسته‌ای و غیرنشاسته‌ای تقسیم می‌شوند (۶۳). واحدهای مونوساکاریدی توسط پیوندهای گلیکوزیدی در ساختمان پلی‌ساکاریدها به همدیگر متصل می‌شوند. اگر همه واحدهای مونوساکاریدی موجود در ساختمان پلی‌ساکاریدها از یک نوع باشند به آنها هموپلی‌ساکارید[1] و در صورتیکه واحدهای مونوساکاریدی از دو یا چند نوع باشند به آنها هتروپلی‌ساکارید[2] گفته می‌شود (۲۷). نوع پیوندها، موقعیت و شکل واحدهای ساختاری مونوساکاریدها در زنجیرهٔ پلی‌ساکاریدی، شکل زنجیرهٔ پلی‌ساکاریدها را تعیین می‌کند (۱۶). از لحاظ منبع پلی‌ساکاریدها از منابع زمینی، دریایی و متابولیت‌های خارج سلولی برخی باکتری‌ها حاصل می شوند.

از ویژگی‌های پلی‌ساکاریدها می‌توان به مقاومت آنها نسبت به سردی و خشکی به دلیل اتصالات آبی آنها اشاره کرد. هنگامی که پلی‌ساکاریدها استخراج و خالص‌سازی می‌شوند، به عنوان یک غذای سالم برای انسان مطرح هستند. علاوه بر این، آنها به عنوان یک ماده مهم صنعتی، علمی و پزشکی به شمار می‌آیند. سلولز که فراوانترین پلی‌ساکارید در ساختار بافت‌های گیاهی است و نشاسته که ترکیبی پرانرژی است، عموما در دانه ذخیره می شوند. مونومرهای سازنده پلی‌ساکاریدها دارای اشکال حلقوی صندلی یا قایقی هستند که پایدارترین حالت را شکل صندلی دارد (شکل ۱-۱). پلی ساکاریدها می توانند حاوی مقادیر مختلفی از گروه‌های متیل، استیل، پیرویل و غیره باشند (۵۵).

شکل ۱-۱: اشکال قایق (الف) و صندلی (ب) قندها (۲۹).

ساختار سه‌بعدی یا شکل زنجیرهای پلی‌ساکاریدها توسط واحدهای مونوساکاریدی و موقعیت و نوع پیوندهای گلیکوزیدی تعیین می‌شود. شکل‌های پیوند نواری و مارپیچ توخالی دو شکل اصلی برای زنجیرهای پلی‌ساکاریدی محسوب می‌شوند (۶۳).

1 Homopolysaccharide
2 Heteropolysaccharide

پلی ساکاریدها را عموما گلیکان[1] ها می نامند که از لغت عمومی گلیکوز به معنی شکر یا مونوساکارید گرفته شده است. نام پلی‌ساکاریدها توسط جایگزینی پسوند "اوز"[2] در نام قند معین توسط پسوند "ان"[3] تشکیل می‌شود، در نتیجه فروکتان به پلیمرهای از فروکتوز، گزیلان به پلیمرهایی از گزیلوز و گالاکتومانان به پلیمرهای ترکیبی از گالاکتوز و مانوز اطلاق می‌شود. بسیاری از پلی‌ساکاریدها برای مدت زمان طولانی است که با نام های عمومی شناخته می شوند مثلا سلولز، نشاسته، گلیکوژن، کیتین و اکنون همان اسامی قدیمی برای آنها کاربرد دارد.

پلی‌ساکاریدها دارای عملکردهای بیولوژیکی متنوعی هستند که در زیر به برخی از آنها اشاره می‌گردد (۵۴):

- ذخیره سازی انرژی شیمیایی به دست آمده از خورشید طی فرایند فتوسنتز
- مواد ساختاری برای دیواره سلولی گیاهان و میکروارگانیسم‌ها و پوشش حشرات و دیگر بندپایان
- حفاظت از موجودات زنده به خصوص میکروارگانیسم‌ها از تغییرات در محیط زیست مانند تغییرات دما، pH و غلظت اکسیژن
- تثبیت موجودات در محیط زیست خاص
- نگه‌داری موجودات در برابر تهاجم دیگر موجودات زنده و ویروس‌ها و محافظت در برابر تخریب ناخواسته توسط واکنش های مرتبط با سیستم ایمنی
- عمل به عنوان روان کننده در حرکت عضلات و مفاصل
- شرکت در ساختار پوست، غضروف و تاج
- شناخت بیولوژیکی عوامل درگیر در عفونت و ایمنی
- اتصال گیرنده و پاسخ در هدایت سیگنال.

۱-۱-۲- طبقه‌بندی و کاربرد

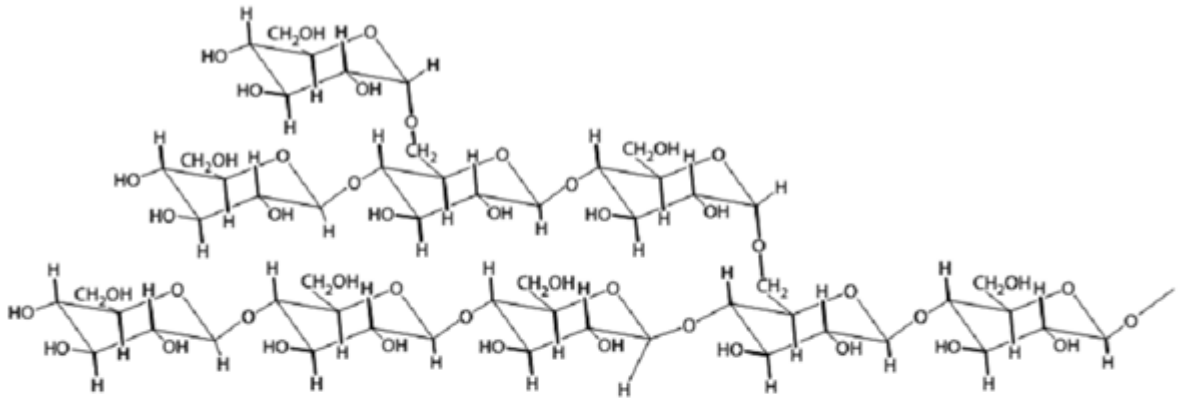
پلی‌ساکاریدها از نظر نوع بار به دو دستهٔ بزرگ پلی‌ساکاریدهای یونی و خنثی تقسیم می‌شوند. نشاسته و سلولز پلی ساکاریدهای خنثی هستند. گروه‌های یونی طبیعی در پلی‌ساکاریدها گروه‌های اُرونیک،

1 Glycan
2 Ose
3 An

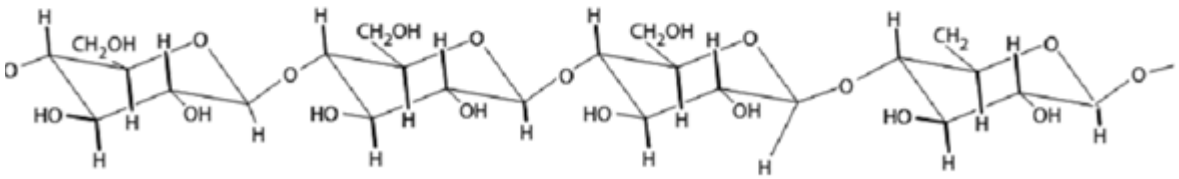
سولفوریک و اسید فسفریک است. پلی‌ساکاریدهای خنثی و یونی دارای طبیعت آب دوست هستند و توزیع موقعیت‌ها و انشعابات در پلی‌ساکاریدها می تواند تصادفی یا یکنواخت باشد (۵۵).

پلی ساکاریدها بر اساس منبع، روش جداسازی، عملکرد، بافت، برگشت‌پذیری حرارتی و زمان بستن ژل نیز طبقه‌بندی می‌شوند. برای مثال در فهرست لغات و اسامی علوم، پلی‌ساکاریدها بر اساس علم شیمی آرایش یافته‌اند، اما در علوم غذایی، یک طبقه‌بندی از پلی‌ساکاریدهای غیرژل شونده وجود دارد که بیان می کند دیسپرسیون های آبکی از هیچ جزئی از طبقه‌بندی انجام شده نباید تحت فرایندهای غذایی و شرایط آماده‌سازی سفت شود، در حالی که عملکرد اولیه را نیز باید داشته باشند. پلی‌ساکاریدها توسط توانایی آنها در بهره‌مندی از خصوصیات مشترک یا نقش آنها در بهبود ماهیت خوراکی‌ها از نظر مباحث تغذیه‌ای و کیفیت فرایند غذایی قابل طبقه بندی به دسته های مختلفی هستند (۵۵).

تعداد واحدهای مونوساکاریدها در ساختار پلی‌ساکاریدها متنوع است و بر این اساس پلی ساکاریدها به سه دسته کوتاه، متوسط و بلند زنجیر تقسیم می‌شوند. پلی‌ساکاریدها می‌توانند خطی مانند سلولز و دارای انشعاب در فواصل منظم و نامنظم مانند آمیلوپکتین یا حلقوی باشند (شکل ۱-۲) (۲۷).



۱) ساختار پلی ساکارید منشعب



۲) ساختار پلی ساکارید خطی

شکل ۱-۲: ساختار دو توع پلی ساکارید ۱) منشعب ۲) خطی (۶۳).

قند غالب در ترکیب پلی‌ساکاریدها، نام عمومی آنها را مشخص می‌کند مثلا فروکتان از فروکتوز و گالاکتان از گالاکتوز تشکیل شده است.

عمل استخراج مواد مختلف از زمان های قدیم تا به امروز رایج بوده است و این عمل توسط حلال های مختلف انجام می گیرد. روش های متفاوتی برای استخراج مواد مختلف وجود دارند که می‌توانند به صورت اختصاصی جهت استخراج ترکیبات مختلف گیاهی به کار برده شوند. نوع بافت های گیاهی و ترکیبات آنها بر روی حلال مورد استفاده و روش استخراج تاثیر گذار است. پلی ساکارید ها معمولا از مواد گیاهی یا از مخلوط های غذایی توسط آب داغ استخراج و سپس با اضافه کردن حلال هایی مانند اتانل یا استون رسوب داده می شوند. دی متیل سولفوکسید مهم ترین حلال استفاده شده است. خالص سازی و تست های مورد نظر برای همگن سازی توسط کاربرد انواع متنوع از روش های کروماتوگرافی و الکتروفورتیک در ترکیب با همدیگر انجام می شود (۵۲،۴).

۱-۱-۳- انحلال در آب

بیشتر پلی‌ساکاریدها دارای واحدهای گلیکوزیل[1] هستند که به طور متوسط، سه گروه هیدروکسیل دارند. بعبارت دیگر پلی‌ساکاریدها پلی‌ال[2]هایی هستند که هر گروه هیدروکسیل در آنها امکان برقراری پیوندهای هیدروژنی برای ایجاد یک یا تعداد بیشتر مولکول‌های آب را دارد. همچنین، اتم اکسیژن موجود در حلقه و اتم اکسیژن گلیکوزیدی به یک حلقه قند دیگر در جهت مخالف متصل می‌شوند که می‌توانند پیوندهای هیدروژنی با آب تشکیل دهند. با وجود هر واحد قند، زنجیره یک ظرفیت جدید در جهت نگه‌داشتن مولکول‌های آب را دارد. پیوندهای هیدروژنی تاثیر ویژه ای بر روی انحلال پلی‌ساکارید-ها در آب دارند. پلی ساکاریدها دارای میل ترکیبی قوی برای اتصال با آب هستند و هنگامی که آب در دسترس باشد به آسانی هیدراته می‌شوند. در سیستم‌های آبی، اجزای پلی‌ساکاریدها می‌توانند آب را جذب کنند (۲۷).

حلالیت پلی‌ساکاریدها به پیوند هیدروژن درون مولکولی و ممانعت فضایی بستگی دارد. پلی ساکاریدهای شاخه‌دار[3] بیشتر در آب محلول هستند و نسبت به پلی ساکاریدهای فاقد شاخه قابلیت جذب مجدد آب سریع تری دارند (۶۳).

۱-۱-۴- خالص سازی

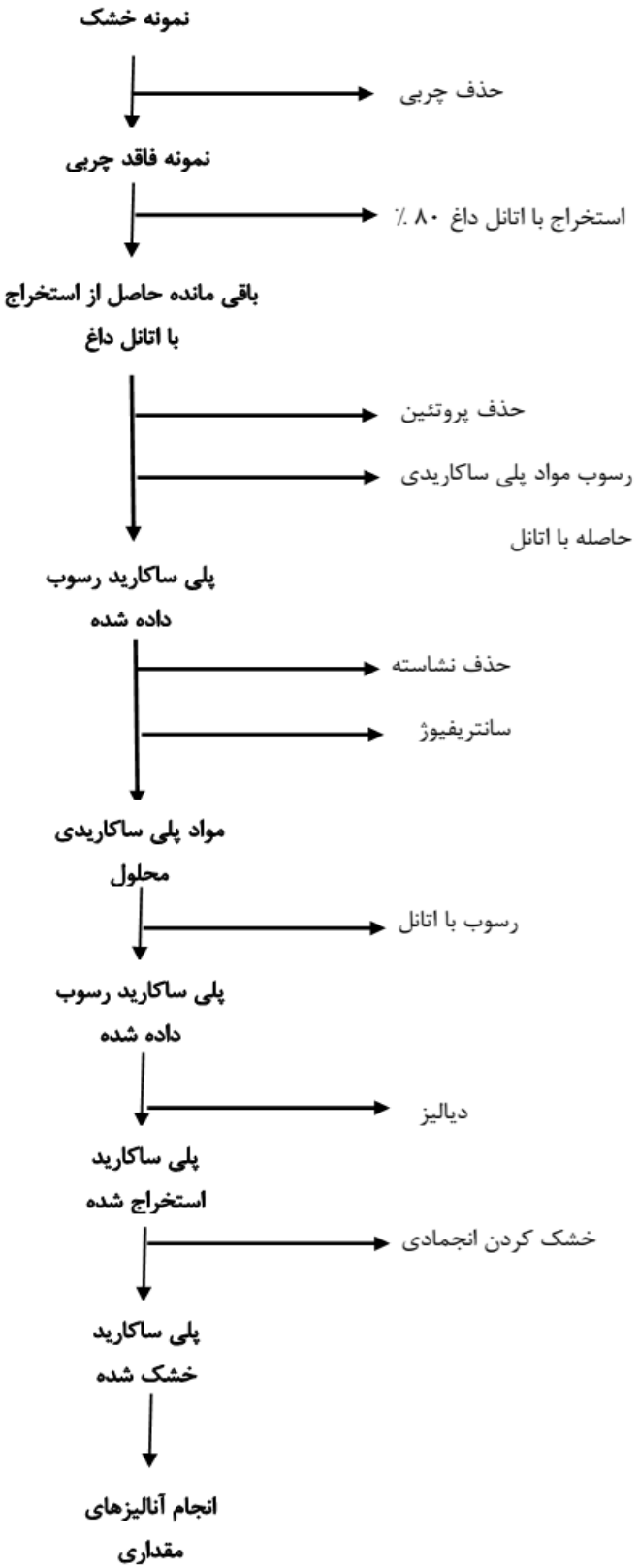
مواد غذایی خام، تولیدات آنها و برخی عناصر پیچیده، بدلیل ماهیت بیولوژیکی شان ممکن است سبب ایجاد ممانعت در اندازه گیری دقیق مونو و الیگوساکاریدهای سازنده پلی ساکاریدها شوند مخصوصا اگر

1 Glycosyl
2 Polyol
3 Branched polysaccharides

یک روش طیف سنجی برای شناسایی مورد استفاده قرار گیرد. این اشتباه در اندازه‌گیری ممکن است بدلیل جذب نور ترکیبات ناخالص ذکر شده در طول موج های مورد استفاده برای بررسی کربوهیدرات‌ها یا مواد انحلال ناپذیر ناشی شود برای مثال مواد کلوئیدی که قابلیت پراکندگی نور دارند، به دلیل آنکه پراکندگی نور به عنوان جذب نور در نظر گرفته می‌شود سبب ایجاد خطا در اندازه‌گیری می شوند. همچنین، گروه‌های آلدئیدی[1] و کتونی[2] قندها می‌توانند با دیگر ترکیبات مانند گروه‌های "آمین"[3] پروتئین‌ها واکنش دهند (واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی یا میلارد) و سبب تغییر رنگ و در نهایت تخریب مواد قندی شوند. حتی اگر روش‌های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[4]، برای آنالیز قندها مورد استفاده قرار گیرد، مونو و الیگوساکاریدها باید از دیگر ترکیبات غذایی قبل از انجام کروماتوگرافی جدا شوند. کربوهیدرات‌ها در محلول‌های قطبی محلولند. این استخراج بیشتر تخصصی است و توسط یک فرایند ناپیوسته انجام می‌گیرد. استخراج باید حداقل دو بار به علت اطمینان از کامل بودن فرایند استخراج انجام شود. اگر ماده یا محصول غذایی به مقدار جزئی اسیدی باشد، برای مثال یک میوه با pH پایین، خنثی سازی قبل از استخراج به علت جلوگیری از هیدرولیز قند، لازم است، و برای این منظور کربنات کلسیم در طی جریان عادی و دائمی اضافه می‌شود. اتانل ۸۰٪ قادر به حذف، رنگدانه‌ها، اسیدهای آلی و حتی اسیدهای آمینهٔ آزاد و پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین است. چون مونو و الیگوساکاریدها خنثی هستند جداسازی آنها از ترکیبات ناخالص باردار می تواند توسط روش‌های تبادل یون انجام شود (۴۵).

بررسی پلی ساکاریدهای یک محصول غذایی مرکب حاوی لیپیدها، پروتئین ها و سایر مواد کربوهیدراتی در کل دانه، هسته یا حبوبات، از لحاظ کمّی در سیستم مخلوط، کار دشواری است. استخراج شامل چند مرحله است که اساسا" از حذف مواد زاید مانند چربی، پروتئین و سایر مواد کربوهیدراتی از نمونه مورد نظر تشکیل شده است. مراحل مورد استفاده در استخراج به ترکیب نمونه و نوع پلی ساکارید استخراج شده بستگی دارد. با این حال، روش استخراج عمومی با حفظ مراحل مختلف و اساسی در اصول مورد نیاز استخراج، تصفیه و کمیت پلی‌ساکاریدها در سیستم های مواد غذایی وجود دارد. شکل ۱-۳ مراحل مورد استفاده برای استخراج مواد پلی ساکاریدی از یک سیستم غذایی را نشان می دهد (۵۲).

1 Aldehydes
2 Ketone
3 Amino
4 High Performance Liquid Chromatography



شکل ۱-۳- یکی از روش های مرسوم در استخراج پلی ساکاریدها (۵۲).

حالت ایده‌آل استفاده از نمونه خشک برای شروع فرایند استخراج است. خشک کردن ممکن است توسط دو روش خشک کردن انجمادی یا استفاده از آون با هوای گرم برای نمونه مرطوب انجام شود و سپس نمونه خشک شده توسط خرد کردن به قطعات کوچک با اندازه کافی تبدیل می شود. معمولا برای نمونه های حاوی چربی یا مواد غیرقطبی، استخراج با مخلوط ۵ به ۹۵ کلروفرم – متانول در دستگاه سوکسله انجام می گیرد. هگزان نیز برای این منظور استفاده می شود، که مزیت آن صرفا در ایمنی نسبی آن نسبت به کلروفرم است. در ادامه نمونه بدون چربی، پس از خشک شدن، توسط اتانل گرم ۸۰٪ برای حذف مواد قندی با وزن مولکولی پایین، مواد معدنی، رنگدانه‌ها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین تیمار می شود. اتانل ۸۰٪ مورد استفاده در استخراج آنزیم های موجود در نمونه را نیز غیر فعال می‌کند. این مرحله توسط تیمار برای حذف پروتئین ها ادامه می‌یابد. سالیان متمادی روش های مختلفی برای از بین بردن پروتئین از مواد پلی‌ساکاریدی از جمله تیمار با کلروفرم و ۱-بوتانول یا ۱-پنتانول و تری فلئورو تری کلرواتان توسعه یافته‌اند، اما ساده ترین روش استفاده از آنزیم های پروتئولیتیک مانند پروناز یا پاپائین است. سپس مواد پلی‌ساکاریدی استخراج شده با آب توسط چهار حجم از اتانل یا الکل ایزوپروپیل[1] (IPA) رسوب داده می‌شوند (۵۲).

روش های مختلفی برای استخراج پلی ساکاریدها از مواد گیاهی قابل دسترس است، اما روش های موجود برای همه پلی ساکاریدها عمومیت ندارند. این مطلب قابل درک است که ساختار پیچیده و طبیعت متنوع پلی ساکاریدها در گیاهان به ویژگی ها، توسعه حالت و شرایطی از رشد گیاهان وابسته است.

۱-۱-۴-۱- آماده سازی نمونه

آماده سازی نمونه قبل از مراحل مختلف استخراج در روش جداسازی دارای اهمیت خاصی است به عنوان مثال تاثیر فعالیت آنزیمی ذاتی باید به حداقل مقدار خود رسیده و از تخریب میکروبی اجتناب شود. آنزیم های متصل به دیواره سلولی ممکن است فعال شده و باعث تخریب پلی ساکارید به دلیل آسیب بافتی اجتناب ناپذیر در طول آماده سازی نمونه شوند. بنابراین، اقدامات احتیاطی مناسب شامل حذف آب در کوتاه ترین زمان ممکن از گیاهان تازه برداشت شده، ترجیحا با روش های خشک کردن انجمادی و یا همگن سازی در اتانل آبی و سپس خشک کردن در درجه حرارت حدود ۴۰°C و بالاتر از آن ضروری است (۲۶).

۱-۱-۴-۲- شرایط استخراج

انتخاب روش استخراج برای بدست آوردن نتیجه مشخص هنگام استخراج پلی ساکاریدها دارای اهمیت خاصی است و بنابراین تحقیقات گسترده و برنامه ریزی های ویژه ای می طلبد. پلی ساکاریدهایی مانند،

1 Isopropyl alcohol

آرابینوگزیلان ها، آرابینوگالاکتان ها و پکتین ها پلی ساکاریدهای خنثی هستند که به عنوان اجزای محلول و نامحلول در بسیاری از گیاهان وجود دارند. به طور کلی بین بخش محلول و نامحلول پلی ساکاریدها فرقی وجود ندارد و نسبت بین آنها به شرایط مورد استفاده در طول مراحل تولید محلول مانند حالت فیزیکی مواد، تیمار آنزیمی، دما و زمان وابسته است. عملکرد این ترکیبات می تواند بطور قابل توجهی با شرایط استخراج متفاوت باشد. مطالعات نشان داده اند که، علاوه بر عملکرد، ترکیب پلی ساکارید محلول نیز بسیار وابسته به شرایط استخراج هستند (۲۶).

۱-۱-۴-۳- انتخاب حلال

حلال مورد استفاده مهمترین و اصلی ترین عاملی است که باید در استخراج مواد تشکیل دهندهٔ گیاهان مورد توجه قرار گیرد و معمولا با توجه به قسمت های مختلف گیاه و مواد متشکله آن ها انتخاب می گردد. از آنجا که مواد دیگری همراه ترکیبات خام گیاهی وجود دارند که بر روی درجه حلالیت آنها تاثیر می گذارند انتخاب حلال مخصوص برای هر دسته از این ترکیبات بسیار مشکل است (۴). حلال های متنوع زیادی می توانند برای استخراج مواد از بافت های گیاهی مورد استفاده قرار گیرند که در بین آنها، آب در دماهای مختلف اولین انتخاب جهت استخراج پلی ساکاریدهای خنثی است (۲۲).

۱-۱-۴-۴- روش های استخراج

انتخاب روش استخراج بسته به نوع پلی ساکارید جدا شده متفاوت است اما صرف نظر از نوع پلی ساکارید، انجام تیمارها و فرایندهای خاصی قبل از استخراج با حلال توصیه می شود. خرد کردن و پودر کردن بافتهای گیاهی (خصوصا زمانیکه مقادیر زیادی از مواد پلی ساکاریدی مورد نیاز باشد) یکی از این فرایندها است. وجود چربی می تواند با ایجاد محدودیت در نفوذ آب، بر روی کارایی فرایند استخراج اثر منفی بگذارد، لذا حذف ابتدایی چربی از مواد اولیه امری ضروری است. عموما مواد چربی با استفاده از حلال های غیر قطبی نظیر مخلوط کلروفرم-متانل (۵:۹۵ حجمی/حجمی)، اتانل ۹۰٪ و هگزان حذف می شوند. بازروانی[1] با اتانل نیز اغلب جهت غیرفعال سازی آنزیم های هیدرولیز کننده موجود در مواد بیولوژیکی انجام می شود (۲۲).

همانطور که قبلا ذکر شد، آب یکی از رایجترین حلال های مورد استفاده برای استخراج پلی ساکاریدهای خنثی است. معمولا با افزایش دمای محلول آبی، قابلیت استخراج پلی ساکاریدها افزایش می یابد. پلی ساکارید های اسیدی مانند پکتین ها، توسط ایجاد کمپلکس محکم بین یون های فلزی دو ظرفیتی و

1 Refluxing

عوامل تشکیل دهنده کمپلکس مانند اگزالات آمونیوم، هگزا متا فسفات سدیم و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[1] بصورت محلول در می آیند (۳۱).

استفاده از محلول های اسیدی برای استخراج پلی ساکاریدها بدلیل احتمال هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی چندان رایج نیست. با این حال تهیه تجاری پکتین ها از پوست مرکبات بوسیله استخراج توسط محلول های آبی اسیدی در دمای ۵۰-۹۰°C انجام می شود (۲۲).

محلول های قلیایی بطور گسترده ای جهت استخراج پلی ساکاریدهای دیواره سلولی استفاده می شود. معمولا به محلول استخراجی بوروهیدرات سدیم[2] اضافه می شود تا احتمال خطر مکانیسم حذف بتا[3] (حذف پی در پی مونوساکاریدها از انتهای احیا کننده زنجیر پلی ساکاریدی) را که ممکن است در pH های بالا اتفاق بیفتد کاهش دهد. تصور می شود که اتصالات کووالانسی و غیرکووالانسی، تحت شرایط قلیایی شکسته شده و در همان مراحل آغازین از داخل شبکه کمپلکس دیواره های سلولی پلی ساکاریدهای غیر قابل استخراج آزاد می گردند. پلی ساکاریدهایی آزاد شده با این روش از دیواره های سلولی، بلافاصله در آب حل می شوند (۳۱-۲۲).

۱-۱-۵- خالص سازی

روش های استخراج ذکر شده در بالا منجر به تولید محلول هایی می گردد که علاوه بر پلی ساکارید مورد نظر، حاوی مخلوطی از ترکیبات (یعنی سایر پلی ساکاریدها به همراه مواد غیر کربوهیدراتی) هستند. بنابراین بایستی محلول های بدست آمده برای جداسازی یک پلی ساکارید بخصوص، به مقدار بیشتر خالص سازی شوند. رعایت نکات زیر قبل از جداسازی پلی ساکارید مورد نظر، لازم است (۳۱):

- چون حجم محلول های حاصله زیاد است بهتر است حجم آنها به کمک دستگاه تبخیر کننده تحت خلا (شکل ۱-۴)، کاهش یابد.

- برای جلوگیری از فساد محلول ها توسط مخمرها، کپک ها و باکتری ها، چند قطره تولوئن به آن اضافه شود.

- برای جلوگیری از تجزیه شدن یا از بین رفتن مواد کربوهیدراتی موجود در محلول ها، باید همواره محلول های غلیظ شده را تا مرحله جدا کردن و خالص سازی در یخچال نگهداری کرد.

- حتی الامکان سعی شود مرحله خالص سازی بلافاصله پس از استخراج انجام گیرد.

1 EDTA
2 Sodium borohydrate
3 β -elimination

شکل ۱-۴: دستگاه تبخیر کننده تحت خلا. بالن حاوی محلول پلی ساکاریدی (۱)، مخزن آب گرم (۲)، موتور (۳)، تقطیر کننده یا کندانسور (۴)، بالن جمع آوری مواد تقطیر شده (۵) (۴۵).

۱-۱-۵-۱- حذف پروتئین ها

پروتئین ها دسته مهمی از ترکیبات غیر کربوهیدراتی هستند و باید طی مرحله خالص سازی حذف شوند. روشهای گوناگونی نظیر هضم آنها توسط آنزیم های پروتئولیتیک (پاپائین یا پروتئازهای باکتریایی)، ترسیب توسط اسید تری کلرو استیک[۱] یا اسید سولفوسالیسیلیک[۲]، واسرشتن[۳] پروتئین ها توسط کلروفرم (روش سواگ[۴])، جذب پروتئین ها بر روی کلیت ها[۵]، خاک دیاتومه و خاک های رس و در نهایت حذف پروتئین ها توسط عبور محلول حاوی پلی ساکارید و پروتئین از رزین های تبادل کننده کاتیونی قوی به شکل H^+، جهت حذف آنها از محلول های کربوهیدراتی وجود دارد (۲۲).

انتخاب هر کدام از روش های بالا به عوامل مختلفی از جمله نوع پلی ساکارید مورد نظر که باید خالص سازی شود، میزان در دسترس بودن مواد اولیه مورد نیاز در آزمایشگاه برای هر کدام از روشهای ذکر شده در بالا و غیره وابسته است. از بین روش های عنوان شده در بالا، روش سواگ به دلیل سادگی و موجود بودن مواد مورد نیاز، بیشتر از بقیه متداول بوده و در زیر به ذکر این روش اکتفا می کنیم.

1 Trichloroacetic acid (TCA)
2 Sulfosalicylic acid
3 Denaturation
4 Sevag
5 Celite

۱-۱-۵-۱-۱- حذف پروتئین ها توسط روش سواگ

اولین بار سواگ یکی از متداولترین روشها برای حذف پروتئین ها از محلول های حاوی پلی ساکارید را معرفی کرد. در این روش پروتئین ها در یک امولسیون حاوی کلروفرم واسرشت شده و پس از فرایند سانتریفیوژ کردن، یک لایه ژل مانند را در حد واسط کلروفرم-آب تشکیل می دهند. به این صورت پلی ساکاریدهای بدون پروتئین به آسانی از فاز آبی موجود در بالای لایه ژلی جدا می شوند. برخی اوقات برای سرعت بخشیدن به فرایند واسرشت کردن از یک بافر با pH ۴-۵ به جای آب استفاده شده و افزودن مقدار کمی ۱-بوتانل[1] یا ۱-پنتانل[2] ضروری است. چون این روش قادر به حذف مقادیر کمی پروتئین در هر مرحله است در اغلب موارد لازم است به دفعات تکرار شود تا پروتئین ها کاملا حذف شوند. مقادیر دقیق هر کدام از مواد مورد استفاده و چگونگی انجام کار در روش سواگ به تفصیل در فصل مواد و روش ها بیان شده است (۵۱).

۱-۱-۵-۲- حذف سایر ناخالصی ها

حذف سایر ناخالصی ها از پلیمرهای کربوهیدراتی توسط هضم آنها با آنزیم های هیدرولیز کننده مناسب و یا روشهای کروماتوگرافی و شیمیایی انجام می شود. در روش استفاده از آنزیم باید از آنزیم های بسیار خالص که فاقد فعالیت های جانبی هستند استفاده شود. برای مثال آلفا-آمیلاز حاصل از بزاق یا آلفا-آمیلاز حاصل از پانکراس خوک بدلیل خلوص و فقدان دیگر فعالیت های آنزیمی برای هیدرولیز ناخالصی ها از پلیمر های نشاسته ای مناسب هستند در حالیکه آلفا-آمیلاز بدست آمده از باسیلوس سوبتیلیس[3] در بیشتر موارد آلوده به بتا-گلوکانازها[4] است (۲۲).

ترکیبات محلول با وزن مولکولی پایین که در اثر هیدرولیز تولید شده اند توسط دیالیز حذف می شوند و پلیمرهای کربوهیدراتی در نهایت توسط اتانل رسوب داده می شوند.

برای جداسازی پلی ساکاریدها روشهای متفاوتی بر اساس اختلاف در حلالیت یا ترسیب انتخابی[5] تکامل یافته است. برای مثال بتا-گلوکان ها در عصاره های آبی حاصل از جو از آرابینو زیلان ها توسط ترسیب با سولفات آمونیوم قابل جداسازی هستند زیرا بتا-گلوکان ها قادر به رسوب در محلول های سولفات آمونیوم[6] با درجه اشباعیت بسیار پایین تر (۲۰-۵۰٪) نسبت به آرابینو زیلان ها (۵۵-۹۵٪) هستند. آرابینو گالاکتان ها حتی در محلول های سولفات آمونیوم ۱۰۰٪ اشباع، محلول اند بنابراین روش جداسازی آرابینو گالاکتان ها از آرابینو زیلان ها در عصاره های مذکور مشابه روش ذکر شده در بالا

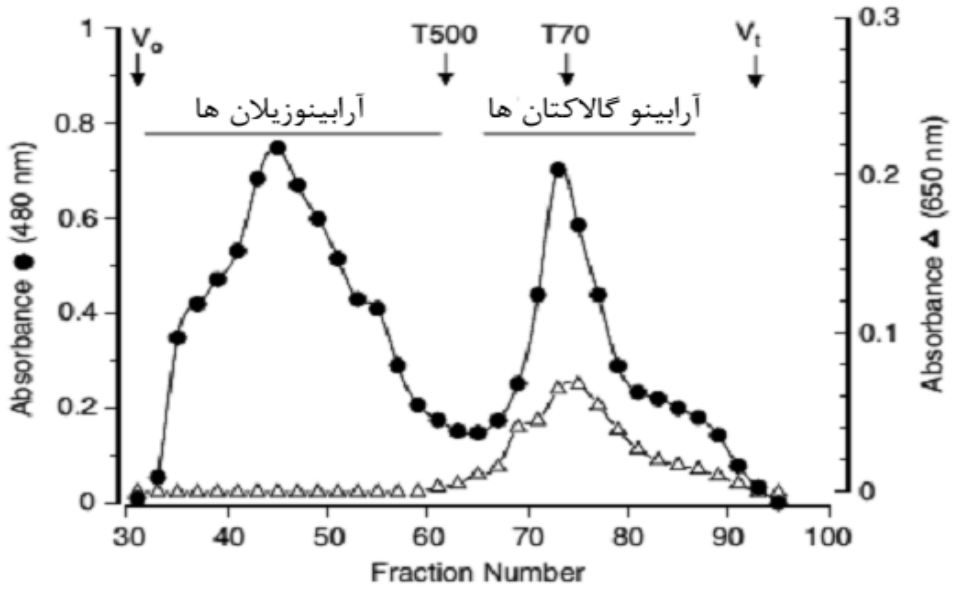
1 1-butanol
2 1-pentanol
3 Bacillus subtilis
4 β -glucanases
5 Selective precipitation
6 Ammonium sulphate

است. مثالی دیگر، تشکیل کمپلکس نامحلول آمیلوز با بوتانل و جداسازی آن از محلولهای حاوی آمیلوپکتین است. بیشتر پلی ساکاریدهای آنیونی با تبدیل شدن به نمکهای ستیل پیریدینیوم[1] به شکل نامحلول در می آیند. کاپا-کاراجینان ها[2] در حضور نمکهای پتاسیم نامحلول می شوند در حالیکه آلجینات ها و پکتین های حاوی متوکسیل کم[3] برای ترسیب نیازمند یونهای کلسیم هستند (۳۱).

پلی ساکاریدهای خنثی قادر به تشکیل کمپلکس هایی بین گروه های هیدروکسیل (که بطور مناسبی در ساختار قرار گرفته اند) و یونهای فلزی هستند. برای مثال مانان ها و زیلان ها با واکنشگر قلیایی مس تشکیل کمپلکس می دهند در حالیکه گلوکومانان ها قادر به ایجاد کمپلکس با نمک های باریوم هستند (۲۲).

روش های کروماتوگرافی مختلفی برای جداسازی پلی ساکاریدها از یکدیگر و نیز از ناخالصی های غیر کربوهیدراتی مورد استفاده قرار می گیرند. کروماتوگرافی ژل تراوا[4] برای هر دو گروه پلی ساکاریدهای خنثی و آنیونی مناسب است. در این روش جداسازی پلی ساکاریدها بر اساس وزن مولکولی و حجم هیدرودینامیک آنهاست. برای مثال آرابینو زیلان ها و آرابینو گالاکتان ها بخوبی توسط کروماتوگرافی ژل تراوا با ستون های سفارز[5] از همدیگر قابل جداسازی هستند (شکل ۱-۵) (۲۲، ۶۱).

1 Cetylpyridinium
2 Kappa-carrageenan
3 Low methoxyl pectin
4 Gel filtration chromatography
5 Sepharose



شکل ۱-۵: جداسازی اجزای تشکیل دهنده پنتوزان محلول در آب گندم (آرابینوزیلان و آرابینو گالاکتان ها-پپتید) توسط کروماتوگرافی ژل تراوا روی سفارز CL-4B. میزان جذب در ۴۸۰ و ۶۵۰ نانومتر به ترتیب مطابق با کربوهیدراتها (دایره) و پروتئین ها (مثلث) است (۲۲).

برای جداسازی پلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی از همدیگر کروماتوگرافی تبادل یون با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل-سلولز[1] بسیار متداول و اختصاصی است. در این نوع از کروماتوگرافی، پلی ساکاریدهای خنثی از داخل ستون بدون برقراری اتصال عبور می کنند در حالیکه پلی ساکاریدهای اسیدی به علت دارا بودن بارهای منفی در داخل ستون باقی مانده و در نهایت بوسیله بافرها، با افزایش قدرت یونی یا pH، از ستون شسته و خارج می شوند.

۱-۱-۶-ترسیب پلی ساکاریدها

سرانجام پس از طی کردن مراحل مختلف خالص سازی، پلی ساکاریدهای باقیمانده در محلول، توسط الکل یا استن رسوب داده می شوند. ترسیب پلی ساکاریدها با الکل می تواند توسط غلظت و وزن مولکولی آنها تحت تاثیر قرار گیرد. بدین معنی که پلی ساکاریدها در محلول های بسیار رقیق رسوب نکرده و یا پلی ساکاریدهایی که دارای وزن مولکولی بسیار کمی می باشند امکان دارد که با الکل رسوب داده نشوند. معمولا پلی ساکاریدها با اضافه کردن ۳ یا ۴ حجم الکل به محلول های پلی ساکاریدی رسوب می کنند. در نهایت پلی ساکاریدها پس از طی کردن مراحل دیالیز (برای اطمینان از حذف

1 Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose

محصولات بدست آمده از تجزیه آنزیمی و نمکهایی با وزن مولکولی پایین) توسط روش انجمادی[1] خشک می شوند (۲۲).

۱-۱-۷- شناخت و تشخیص ساختمان شیمیایی مولکولی

اسچولز[2] برای اولین بار از اصطلاح "همی سلولز" برای یک گروه از پلی ساکاریدهای استفاده کرد که با استخراج مواد حاوی دیواره سلولی با مواد قلیایی به دست آمده بودند. او این اجزای دیواره سلولی را از نظر شیمیایی و ساختاری مربوط به سلولز در نظر گرفت و به علت ارتباط احتمالی این اجزا با سلولز، آن را به عنوان پلی ساکاریدهای "همی سلولز" می شناسند (۴۳).

بسیاری از مسائل و مشکلات تعیین ساختمان شیمیایی مواد توسط پیشرفت سریع روشهای طیف سنجی[3] در طی ۲۰ سال اخیر حل شده است زیرا قبل از معرفی این روشها تعیین ساختمان مولکولی مواد، بسیار وقت گیر و خسته کننده بود و از طرف دیگر به مقادیر زیادی ماده خالص نیاز داشت که بدست آوردن آنها کار ساده ای نبود. با اختراع این وسایل بسیاری از این مشکلات رفع شده است (۴).

برای تعیین ساختمان شیمیایی مواد ناشناخته، اطمینان پیدا کردن از خالص بودن این اجسام بسیار مهم است زیرا وجود کمترین میزان ناخالصی ممکن است اطلاعات گمراه کننده به ما بدهد. روشهای مختلفی برای تعیین درجه خلوص پلی ساکاریدها وجود دارد. در اغلب موارد میزان محتوی نیتروژن نشانگر سطوحی از آلودگی با پروتئین ها است. این روش برای پلی ساکاریدهایی مانند بتا-گلوکان ها، آرابینو زیلان ها، سلولز، صمغ زانتان، ژلان، کاراجینان ها و آلجینات ها که باید حاوی سطوح پایینی از پروتئین باشند بخوبی قابل اجرا است. ثبات در ترکیب مونوساکاریدها و نسبت مولی قندها پس از مراحل خالص سازی مکرر، نشان دهنده خلوص پلی ساکاریدهای تهیه شده است. نمودارهای شستشوی بدست آمده از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی (تعداد پیک ها، اندازه و تقارن آنها) یا کروماتوگرافی جدا کننده بر اساس اندازه مولکولی (ممانعت مولکولی)[4] نیز می تواند نشان دهنده خلوص پلی ساکاریدهای بدست آمده باشد (۲۲). پس از اطمینان از خلوص مواد، آنها در معرض آزمایشاتی برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی قرار خواهند گرفت. یکی از روش های که با استفاده از آن می توان خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این اجسام را کشف کرد، روشهای طیف سنجی است که عناصر موجود در ماده مورد آزمایش را از نظر کمی و کیفی مشخص می کند. توسط اطلاعاتی که از این طریق حاصل می شود می توان گروه های شیمیایی موجود در جسم مورد نظر را پیدا کرد و با انجام آزمایشات شیمیایی مجدد، به تایید مطالب فوق پرداخت. بنابراین می توان ساختمان مولکولی یا احتمالی اجسام مورد آزمایش را بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی حدس زد. در برخی موارد ساختمان ناشناخته مورد آزمایش به

1 Freeze dried
2 Scholz
3 Spectroscopic
4 Size exclusion

قدری پیچیده است که اطلاعات داده شده نمی تواند ساختمان مولکولی را تعیین کند، لذا باید آنرا تحت اثر واکنش های شیمیایی به مولکول های ساده تر با وزن مولکولی پایین تبدیل و سپس آنها را به هم متصل نمود تا ساختمان اصلی مشخص شود (۴).

تعیین ساختار پلی ساکاریدهای گیاهی اغلب مشکل است زیرا بر خلاف بسیاری از پلی ساکاریدهای میکروبی، از واحدهای متوالی غیر متناوب تشکیل شده اند. پی بردن به ساختار کووالانسی کامل یا ابتدایی پلی ساکارید شامل تعیین پارامترهای زیر است:

۱- وزن مولکولی

۲- اجزای مونوساکاریدی سازنده، نوع حلقه ها و ترتیب قرار گرفتن آنها

۳- شکل اتصالات گلیکوزیدی و نوع آنها

۴- درجه شاخه دار شدن و الگوی توزیع آنها

امروزه روشهای مختلفی جهت تعیین ساختار پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار می گیرد که می توان آنها را به سه دسته اصلی تقسیم کرد. این سه دسته عبارتند از روش های شیمیایی، آنزیمی و طیف سنجی.

۱-۱-۷-۱- روش های شیمیایی

۱-۱-۷-۱-۱- تعیین وزن مولکولی

از آنجا که پلی‌ساکاریدهای غیر سلولزی پلی دیسپرس، اندازه مولکولی و وزن مولکولی متغیر دارند می توان از اندازه و وزن مولکولی میانگین به جای آنها استفاده کرد. اندازه‌گیری هر دو نوع وزن مولکولی متوسط نشان دهنده توزیع وزن مولکولی است، چون تفاوت بیشتر بین اندازه مولکولی (M_n) و وزن مولکولی (M_w) نشان می دهد که نمونه مورد نظر بیشتر پلی دیسپرس است. وزن مولکولی متوسط می‌تواند توسط اسمزسنج غشایی به دست آید.

سانتریفیوژ کردن فوق سریع وزن مولکولی متوسط را به ما می‌دهد، که صحت این رقم وابسته به نوع روش مورد استفاده است و این روش از نظر تئوری، مبتنی بر مقادیر متوسط است. با این حال، روش دیگر تعیین وزن مولکولی است که نیاز به پیش تنظیم با نشانگر وزن مولکولی شناخته شده دارد. یکی از روش ها، کروماتوگرافی ژل تراوا است که روش ساده ای است و به طور گسترده ای جهت تعیین وزن مولکولی نسبی نمونه مورد استفاده قرار می گیرد.

روشهای متعددی برای تعیین وزن مولکولی پلی ساکاریدها موجود است. امروزه استفاده از روش های قدیمی نظیر فشار اسمزی، ویسکوزیته و پراکنش نور[1] زیاد متداول نیست و از روشهای جدیدتر نظیر کروماتوگرافی ژل تراوا (غربال مولکولی)[2]، سانتریفیوژ کردن فوق سریع[3] و فراپالایش[4] برای تعیین وزن مولکولی پلی ساکاریدها استفاده می شود. هنگامیکه وزن مولکولی پلی ساکارید بالا است می توان از روش سانتریفیوژ کردن فوق سریع استفاده نمود. لازم به ذکر است که مقادیر وزن مولکولی تعیین شده برای یک پلی ساکارید، میانگین اوزان مولکولی برای آن پلی ساکارید است.

۱-۱-۷-۱-۲- تعیین مونوساکاریدهای سازنده

تعیین ترکیب پلی‌ساکاریدهای غیر سلولزی گیاهان شامل شناسایی و برآورد کمّی ترکیبات مونوساکاریدی سازنده آنهاست. پس از هیدرولیز کامل اسیدی، مونوساکاریدهای آزاد توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[5] یا کروماتوگرافی گازی[6] شناسایی می شوند. کروماتوگرافی مایع نیازمند مشتق سازی نمونه نیست و بنابراین نمونه را می توان بدون تغییر بازیافت کرد. جداسازی در این روش بر اساس تبادل کاتیون/آنیون یا کروماتوگرافی تفکیکی (استونیتریل-آب) و شناسایی مونوساکاریدها در این روش می‌تواند توسط آشکارساز شاخص انکساری انجام شود. حساسیت آشکارسازهای شاخص انکساری کم است و نیاز به مقدار زیادی نمونه (میکروگرم) دارد. کروماتوگرافی گازی نیازمند مقادیر کمی نمونه (نانوگرم) است و نیاز به مشتق سازی دارد در نتیجه امکان بازیافت نمونه میسر نیست. مشتقات حاصله باید پایداری حرارتی مناسبی داشته و به اندازه کافی متنوع باشند. تری متیل استرها (TMS)[7]، تری فلوئورو استیل استرها[8] (TFA) و مشتقات آلدیتول استات بیشتر مورد استفاده می باشند. مونوساکاریدها با استفاده از عوامل کاهنده مانند سدیم تترا هیدروبورات یا دیوتراید پس از استیله شدن با استفاده از استیک انیدرید و پیریدین (۱:۱) تبدیل به آلدیتول استات ها می‌شوند. در دوران اخیر، N-متیل پیریدین به عنوان کاتالیزور در انجام استیله کردن جایگزین شده است. آلدیتول های استات را می توان توسط زمان های نگه داری و در صورت لزوم توسط طیف جرمی آنها شناسایی کرد. تنها یک آلدیتول استات برای هر مونوساکارید در مقایسه با مشتقات متعدد ناشی از اشکال مختلف حلقه (پیرانوز و فورانوز) و آنومرهای آنها (α و β) در جهت مشتقات TMS تشکیل می شود. بسیاری از مونوساکاریدها در حال حاضر به طور طبیعی در شکل دی خود وجود دارند. با این حال، برخی از پلی ساکاریدهای حاوی مونوساکاریدهایی در شکل ال خود هستند. به عنوان مثال، ال-رامنوز در انواع پکتین و ال-آرابینوز در آرابینوگزیلان وجود دارند (۴۳).

1 Ligth scattering
2 Molecular filtration (Gel permeation)
3 Ultracentrifuge
4 Ultrafiltration
5 High performance liquid chromatography
6 Gas chromatography
7 Trimethyl silyl
8 Trifluoroacetyl

برای تعیین ساختار یک پلی ساکارید، مشخص کردن نوع مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید و مقدار کمی هر یک از آنها در ابتدای کار ضروری است. امروزه با وجود روش های کروماتوگرافی، تعیین ترکیب مونوساکاریدهای متشکله یک پلی ساکارید ویژه بطور قابل ملاحظه ای ساده شده است. برای انجام روش های کروماتوگرافی، ابتدا باید پلی ساکارید به واحدهای سازنده خود هیدرولیز شود. روش های مختلفی جهت انجام هیدرولیز توسط پژوهشگران مورد استفاده قرار می گیرد که بر پایه استفاده از اسیدهای کلریدریک، سولفوریک و تری فلورو استیک[1] در دماهای بالا است. برای بیشتر کربوهیدراتها استفاده از اسید تری فلورو استیک نسبت به دو اسید دیگر برتری دارد که علت آن کارایی بالاتر این اسید در هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی بدون تخریب گسترده در ترکیبات مونوساکاریدی بدست آمده و نیز فراریت آن است. فراریت این اسید باعث می شود تا تداخل آن با روشهایی مانند استیله کردن ترکیبات مونوساکاریدی به حداقل برسد (۱۷).

انتخاب روش کروماتوگرافی مورد استفاده وابسته به در دسترس بودن استانداردها و تجهیزات است. از متداولترین روشهای کروماتوگرافی مورد استفاده برای این منظور می توان به کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی کاغذی[2] و کروماتوگرافی تبادل یونی بطور خودکار[3] اشاره کرد که در زیر به شرح دو مورد اول می پردازیم (۴۳).

۱-۱-۷-۱-۲-۱-کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا روش انتخابی برای آنالیزهای مونوساکاریدها و الیگوساکاریدها است که می تواند جهت آنالیز پلی ساکاریدها بعد از هیدرولیز مورد استفاده قرار گیرد. هر دو آنالیز کیفی و کمی توسط این روش صورت می گیرد. آنالیز های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا سریع است، محدودهٔ وسیعی از غلظت های نمونه را تحمل می کند و از دقت و صحت بالایی برخوردار است. در این روش نیازی به مشتق سازی نیست و روشی غیر مخرب[4] است. فازهای ثابت مورد استفاده برای کربوهیدرات ها شامل موارد زیر است:

۱- کروماتوگرافی تبادل آنیون

۲- کروماتوگرافی فاز نرمال

۳- کروماتوگرافی تبادل کاتیون

۴- کروماتوگرافی فاز معکوس

آشکار ساز های مورد استفاده برای کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به شرح زیر می باشد (۴۵):

1 Trifluoroacetic acid (TFA)
2 Paper chromatography
3 Automated ion-exchange chromatography
4 Non-destructive

۱- آشکار ساز ضریب شکست

۲- آشکار ساز الکتروشیمیایی

۳- مشتق ساز پس از ستون

۴- مشتق ساز پیش از ستون

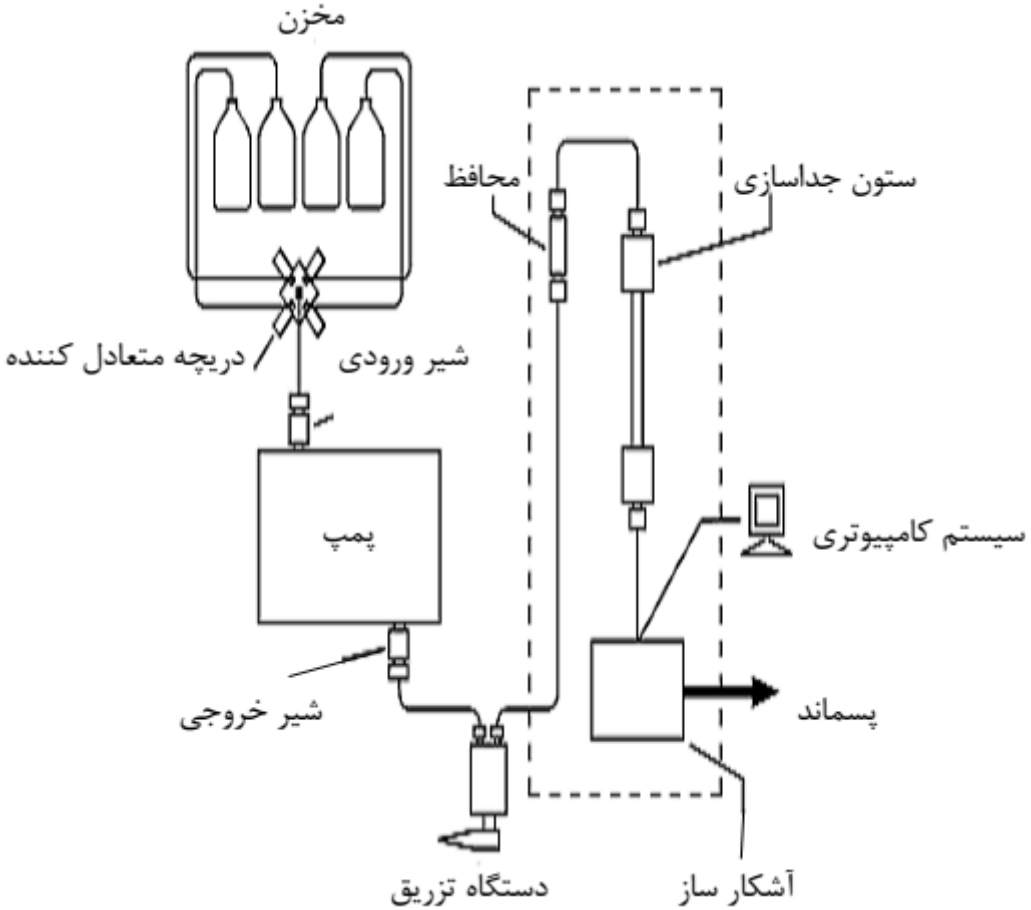
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا محبوب ترین روش برای تجزیه و تحلیل مونوساکاریدهای حاصل از هیدرولیز پلی ساکاریدهاست. از این روش به مدت چندین دهه برای جداسازی و شناسایی کربوهیدرات-ها استفاده شده است. از مزایای این روش نسبت به کروماتوگرافی گازی، تجزیه و تحلیل سریع و عدم نیاز به مشتق سازی نمونه هاست. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همچنین قادر به آنالیز مخلوط پیچیده مونو و الیگوساکاریدها است. این نوع از کروماتوگرافی دارای طیف گسترده ای از فاز ثابت، عامل شوینده و آشکارسازهای مربوط به تجزیه و تحلیل کربوهیدرات ها است. کروماتوگرافی فاز معمولی که در آن فاز ثابت قطبی است، با موفقیت برای تجزیه و تحلیل مونوساکاریدهای آب میوه، میوه و عصاره های گیاهی سلولز هیدرولیز شده و دیواره سلولی گوجه فرنگی هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گرفته است. آشکار سازهای زیادی برای کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (اشعه ماوراء بنفش، فلورسانس و الکتروشیمیایی) قابل دسترس هستند اما محبوب ترین آنها ضریب شکست نور (RI) است. مزیت بارز RIعمومیت آن است اما نقطه ضعف آن، گرادیان فاز متحرک است که اغلب برای جدا کردن مخلوط مونو، دی- و الیگوساکاریدها لازم است (۵۲).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یک روش آنالیز فیزیکی و شیمیایی است که به صورت یک سیستم کروماتوگرافی ستونی مایع عمل می کند. در داخل ستون فلزی، فاز جامد (ثابت) قرار دارد و فاز متحرک بوسیله پمپ های مخصوص با فشار و حرارت مشخصی همراه با ماده مورد آزمایش ابتدا وارد پیش ستون و سپس وارد ستون اصلی می شود. نمونه های تفکیک شده بوسیله ستون سرانجام وارد آشکار ساز شده و مورد ارزیابی و شناسایی قرار می گیرد (۴).

استفاده از این نوع کروماتوگرافی (شکل ۱-۶)، همانطور که ذکر شد نیازی به مشتق سازی ندارد و غیرمخرب است یعنی امکان بازیافت نمونه توسط این روش وجود دارد. جداسازی با این روش یا بر اساس تبادلات کاتیونی-آنیونی و یا کروماتوگرافی تفکیکی[1] (استونیتریل-آب) است و شناسایی مونوساکاریدها با استفاده از آشکار ساز ضریب شکست نور انجام می شود. لازم به ذکر است که حساسیت آشکار ساز ضریب شکست نور پایین است و نیاز به مقادیر زیادی از نمونه (میکروگرم) دارد. کروماتوگرافی

1 Partition chromatography

غربال مولکولی با کارآیی بالا[1] و کروماتوگرافی تبادل آنیونی با pH بالا[2] رایج ترین روش های سازگار شده برای جداسازی پلی ساکاریدها هستند (۴۳).



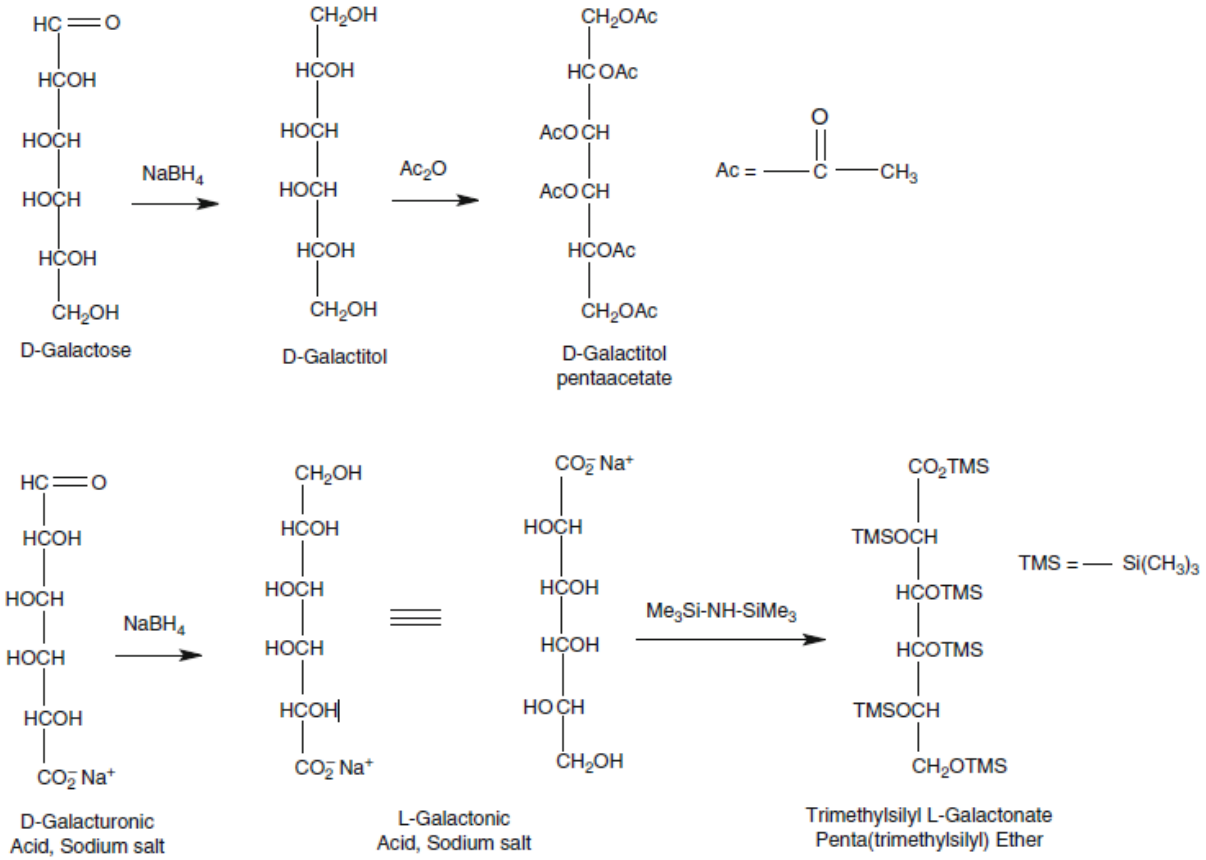
شکل ۱-۶: نمایش ترسیمی یک سیستم کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (۴۵).

۱-۱-۷-۱-۲-۲- کروماتوگرافی گازی

کروماتوگرافی گازی نیز مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا امکان تشخیص کیفی و کمی کربوهیدرات ها را فراهم می کند. در این روش، قندها باید مشتق سازی شوند. این مشتقات آماده شده در شکل ۱-۷ برای دی-گالاکتوز و نمک سدیم دی-گالاکتورونیک اسید نشان داده شده است. تبدیل قندها به مشتقات استیله آلدونونیتریل ها (آلدوزها) و کیتوزیم ها (کتوزها) نیز در روش گروماتوگرافی گازی امکان پذیر است، اگرچه نسبت به استیله کردن آلدوزها و اسیدهای آلدونیک چندان متداول نیست.

1 High performance size exclusion chromatography
2 High pH anion exchange chromatography

آشکار ساز یونش شعله ای نوعی آشکار ساز است که معمولا برای استیله کردن مشتقات کربوهیدرات ها مورد استفاده قرار می گیرد (۵۲).



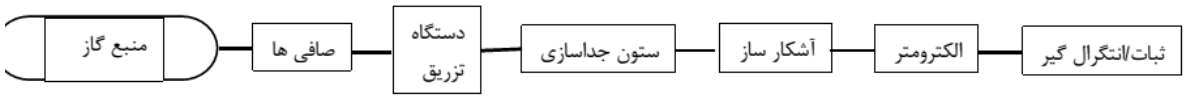
شکل ۱-۷- اصلاح D-گالاکتوز و نمک سدیم D-گالاکتورونیک اسید در آماده سازی برای کروماتوگرافی گازی (۵۲).

کروماتوگرافی گازی به عنوان روشی انتخابی در جداسازی و شناسایی کربوهیدرات‌ها شناخته شده است. انواع روش های مشتق سازی وجود دارد اما معمولا استات‌های آلدیتول و مشتقات TMS به ترتیب برای پلی‌ساکاریدهای خنثی و اسیدی کاربرد بیشتری دارند. روش‌های دقیق برای تهیه آلدیتول استات‌ها و مشتقات TMS در دسترس هستند. بطور خلاصه مواد پلی‌ساکاریدی خنثی استخراج شده ابتدا توسط محلول ۲ مولار TFA هیدرولیز شده و سپس توسط آلدیتول های سدیم تترا هیدروبورات اضافی نامحلول در هیدروکسید آمونیوم احیا می شوند و در انتها سدیم تترا هیدروبورات احیا شده توسط افزودن اسید استیک تخریب می‌شود (۵۲).

فاز ثابت در این روش به صورت جامد یا مایع است و در داخل یک ستون شیشه ای یا فلزی قرار می گیرد و فاز متحرک معمولا شامل گازهای بی اثر نظیر هلیوم، ازت، هیدروژن و آرگون می باشد. نمونه مورد آزمایش پس از تزریق، وارد فاز متحرک می شود و همراه با آن وارد ستون (فاز ثابت) می گردد.

ماده مورد تفکیک در اثر حرارت، بین گاز و فاز ثابت پخش شده که ممکن است حل یا جذب شود. سرانجام نمونه های تفکیک شده بوسیله ستون وارد آشکار ساز شده و مورد ارزیابی و شناسایی قرار می گیرد (۴).

این نوع از کروماتوگرافی به مقادیر کمی از نمونه (نانوگرم) نیاز دارد و بدلیل تبخیر ناپذیری و غیر فرار بودن پلی ساکاریدها، انجام مراحل مشتق سازی ضروری است لذا امکان بازیابی نمونه با این روش وجود ندارد. مشتقات بدست آمده باید مقاومت حرارتی مناسبی داشته و از فراریت کافی برخوردار باشند. تری متیل سیلیل اترها، استرهای تری فلورواستیل و استات های آلدیتول، رایجترین مشتقات مورد استفاده هستند. برای تولید استات های آلدیتول، مونوساکاریدها بوسیله عوامل احیا کننده مانند بروهیدرات سدیم ابتدا به آلدیتول های مربوطه تبدیل شده و سپس با استفاده از انیدرید استیک و پیریدین (نسبت یک به یک)، استیله می شوند. در سالهای اخیر ان-متیل ایمیدازول[1] جایگزین پیریدین شده است. برای هر مونوساکارید در این روش تنها یک آلدیتول استات تشکیل می گردد ولی در روش مشتق سازی تری متیل سیلیل، مشتقات گوناگونی با توجه به اشکال مختلف حلقه ها (پیرانوز و فورانوز) و آنومرها (آلفا و بتا) حاصل می شود (۴۳). قسمت های مختلف یک دستگاه کروماتوگرافی گازی در شکل ۱-۸ نشان داده شده است.



شکل ۱-۸: نمایش طرح کلی یک سیستم کروماتوگرافی گازی (۴۵).

۱-۱-۷-۱-۳- تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی

برای تعیین وضعیت اتصالات گلیکوزیدی از روشهای مختلفی استفاده می شود که از مهمترین آنها می توان به متیله کردن[2]، اکسیداسیون، هیدرولیز اسیدی ناقص (ملایم)[3] و غیره اشاره کرد که در زیر به شرح آنها می پردازیم:

۱-۱-۷-۱-۳-۱- متیله کردن

متیله کردن، قدیمی ترین و کاربردی ترین روش مورد استفاده جهت تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی در پلی ساکاریدهاست. جزئیات این روش بطور کامل در فصل مواد و روش ها بیان شده است اما بطور خلاصه شامل مراحل زیر است:

- متیله کردن کامل پلی ساکاریدها

1 N-methyl imidazole
2 Methylation
3 Partial (mild) acid hydrolysis

- هیدرولیز پلی ساکاریدهای کاملا متیله شده به مخلوطی از مونوساکاریدهای پاره ای متیله
- احیا مونوساکاریدهای متیله شده به آلدیتول ها
- استیله کردن آلدیتول ها
- آنالیز کمی و کیفی استات های آلدیتول پاره ای متیله شده توسط کروماتوگرافی گازی و طیف سنج جرمی

خصوصیات کامل متیلاسیون اولیه پلی ساکاریدهای غیرسلولزی نیاز به شناسایی و تجزیه و تحلیل کمی همه مشتقات مونوساکاریدی بر روی دپلیمریزاسیون تشکیل شده دارد و می‌تواند توسط کروماتوگرافی گازی انجام و بوسیله طیف سنج جرمی تایید شود. معمولا متیل استرها بهتر از مونوساکاریدها توسط مراحل مختلف مایع و با انتخاب مناسب شرایط ستون جدا می شوند. دپلیمریزاسیون پلی‌ساکاریدهای غیر سلولزی متیله شده توسط هیدرولیز انجام می شود. پلی-ساکاریدهای متیله شده حلالیت بسیار کمتری در آب داغ نسبت به آب سرد دارند و برای انجام هیدرولیز جزئی، حلال آلی مثل اسید فرمیک و برای هیدرولیز کامل، اسید رقیق آبی مناسب است. استات های آلدیتول نسبتا متیله شده توسط استیله شدن و سپس احیا مشتقات حاصله به طور گسترده برای تعیین خصوصیات مونوساکاریدهای متیله شده مورد استفاده قرار می گیرند. تفسیر طیف جرمی این ترکیبات معمولا ساده است. با این حال، با این روش اشکال آنومری اتصالات گلیکوزیدی (α یا β) مشخص نمی شود.

توسط روش متیله کردن علاوه بر تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی می توان به اطلاعاتی نظیر نوع حلقه (پیرانوز یا فورانوز)، گروه های انتهای غیر احیا کننده در زنجیر، زنجیر اصلی و نقاط انشعاب آن (شاخه ها) در پلی ساکاریدها پی برد. بعنوان مثال وجود گروه های متوکسیل در کربن های ۴ یا ۵ به ترتیب نشان دهنده حلقه پیرانوز یا فورانوز است. اطلاعات بدست آمده از متیله کردن در مورد وضعیت آنومری اتصالات گلیکوزیدی و بخش باقیمانده مونوساکاریدها در پلی ساکاریدها چندان مفید نبوده و بایستی از روشهای دیگر برای این منظور استفاده شود (۴۳).

۱-۱-۷-۱-۳-۲- هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)

هیدرولیز اسیدی ملایم روشی بسیار مفید در تعیین ساختار پلی ساکاریدها است. پلی ساکاریدها توسط هیدرولیز اسیدی ملایم (برای مثال با اسید سولفوریک ۰/۰۵-۰/۱ نرمال در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد)، بصورت تصادفی به مخلوطی از مونو و الیگوساکاریدها تبدیل می شوند. امکان شکستن نوع ویژه ای از اتصالات آنها نیز به مخلوطهای همسان بطور ترجیحی توسط این روش وجود دارد. با توجه به تفاوت در پایداری اتصالات گلیکوزیدی مونوساکاریدهای مختلف، می توان اطلاعات مفیدی در مورد توالی

گلیکوزها و اتصالات آنها با توجه به شناسایی مونو و الیگوساکاریدهای بدست آمده از هیدرولیز اسیدی ملایم بدست آورد. مونوساکاریدها با حلقه های فورانوز در مقابل اسید بسیار ناپایدارند و به آسانی تحت شرایط هیدرولیز اسیدی ملایم شکسته می شوند. در مورد هگزوپیرانوزها، اتصالات نوع ۱ به ۶ نسبت به سایر اتصالات (۱ به ۲، ۱ به ۳ و ۱ به ۴)، پایدارترند و اتصالات نوع بتا نیز نسبت به اتصالات نوع آلفای مشابه از پایداری بیشتری برخوردارند. بعلاوه اتصالات اسیدهای اورونیک به مونوساکاریدهای خنثی از بقیه اتصالات موجود در ساختار پلی ساکاریدها مقاومتر است (۲۲-۳۱).

روشهای متداول مانند کروماتوگرافی روی کاغذ، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی غربال مولکولی را می توان جهت خالص سازی الیگوساکاریدهای آزاد شده تحت تاثیر هیدرولیز اسیدی ملایم به کار برد. سرانجام الیگوساکاریدهای خالص شده توسط روش های متیله کردن (مشابه آنچه که در مورد پلی ساکاریدها ذکر گردید) جهت تعیین موقعیت اتصالات، درجه چرخش نوری و رزونانس مغناطیس هسته ای پروتون[1] بمنظور تعیین آرایش پروتون های آنومری و کروماتوگرافی گازی همراه با طیف سنج جرمی برای تعیین جرم مولکولی و توالی بقایای مونوساکاریدی سازنده، تعیین هویت می شوند.

۱-۱-۷-۱-۳-۳- اکسایش

شکستن اکسیداتیو پلی‌ساکاریدها و توصیف محصولات آزاد شده، جزئیاتی درباره نحوه آرایش اتصالات، الگوی جانشینی و انواع آنومری اتصالات (α یا β) به ما می‌دهد. پیکربندی آنومری اتصالات گلیکوزیدی پلی‌ساکاریدها می تواند توسط اکسیداسیون تری اکسید کروم تعیین شود. تری اکسید کروم، پلی ساکاریدهای حاوی پیوند بتا را بطور ترجیحی نسبت به پلی ساکاریدهای حاوی پیوند الفا اُکسید می کند. این تفاوت به سهولت شکل گیری استر کتو توسط شکستن پل اکسیژنی ترکیبات آنومری بتا نسبت داده شود. اکسیداسیون پریودات از تکنیک هایی است که به طور گسترده جهت تعیین اتصالات و ترتیب جانشینی استفاده می‌شود. محصولات آزاد شده توسط روش‌های مختلف مانند تیتراسیون، روش‌های اسپکتروفتومتری و یا توسط روش رنگ سنجی اندازه گیری می شوند.

بقایای مونوساکاریدی مقاوم به اکسیداسیون پریودات و آلدئیدهای آزاد شده توسط بروهیدرات سدیم احیا شده و سپس توسط هیدرولیز به مونوساکاریدهای اکسید نشده و واحد های اکسید شده تبدیل می شوند.

1 Proton nuclear magnetic resonance

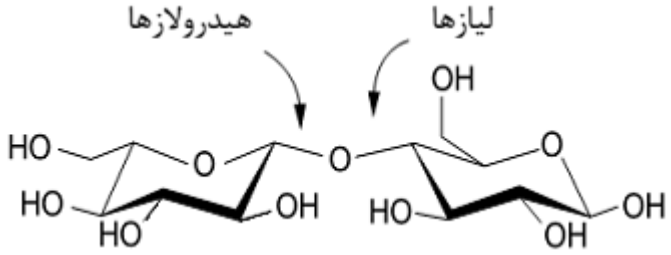
۱-۱-۷-۲- روشهای آنزیمی

ساختار پلی‌ساکاریدها توسط آنزیم های اختصاصی با عملکرد بر روی سوبسترای خاص تعیین می شود. این آنزیم ها پلی ساکاریدها را به مونو یا الیگوساکاریدها با درجات مختلفی از پلیمریزاسیون می شکنند. با تشخیص الیگوساکاریدهای آزاد شده و مواد باقیمانده، ساختار پلی ساکارید اولیه مشخص می شود. آنزیم‌هایی که پلی ساکاریدهای غیر سلولزی را تجزیه می کنند به دو گروه اگزو و اندو دسته‌بندی می‌شوند که بستگی به نوع فعالیت آنها دارد. اگزوگلیکوزیدازها واحد مونو یا دی‌ساکارید را از انتهای غیر احیاء کننده پلی ساکاریدها حذف می کنند، در حالیکه اندوگلیکوزیدازها به طور تصادفی مناطق غیر شاخه ای از زنجیره‌های داخلی و خارجی را مورد حمله قرار می دهند که منجر به آزادسازی الیگوساکاریدها با درجات متفاوتی از پلیمریزاسیون می‌شود.

آنزیم ها می توانند برای تعیین مقادیر کمی و کیفی کربوهیدراتها مورد استفاده قرار گیرند. استفاده از آنزیم ها دارای مزایای زیر است (۴۳):

- اختصاصی بودن (بر اساس نوع مونوساکاریدها و نوع اتصال)
- فقدان محصولات فرعی
- سرعتهای بالای واکنش
- تکرار پذیری

هیدرولیز آنزیمی اتصالات گلیکوزیدی بوسیله هیدرولازها[1] با شکستن پیوند گلیکوزیل-اکسیژن صورت می گیرد در حالیکه برخی از آنزیم ها مانند الیمینازها[2] و لیازها[3] با مکانیسم متفاوتی عمل می کنند و پیوند اکسیژن-آگلیکون را در پلی ساکاریدهای اسیدی مورد هدف قرار می دهند (شکل ۱-۹).



شکل ۱-۹: نحوه عمل هیدرولازها و لیازها بر روی مناطق اتصال (۲۲).

1 Hydrolases
2 Eliminases
3 Lyases

معمولا سایر روش ها مانند روشهای کروماتوگرافی، طیف سنج جرمی و رزونانس مغناطیس هسته‌ای جهت تصدیق نتایج بدست آمده از روش آنزیمی به کار گرفته می شوند (۳۱، ۴۳).

۱-۱-۷-۳- روش های طیف سنجی

روش های طیف سنجی در بیشتر موارد ساده تر از روش های دیگر است و جزئیات بیشتری را در ارتباط با ساختار برای پژوهشگران فراهم می آورد بطوریکه داده های حاصل از این روش تکمیل کننده داده های حاصل از روش های شیمیایی و آنزیمی است. وزن مولکولی، فرمول مولکولی، گروه های شیمیایی و بالاخره تجزیه به مواد ساده تر و تبدیل به مشتقات دیگر شیمیایی را می توان توسط داده های حاصل از طیف ها بررسی و مشخص نمود. از برخی از اساسی ترین روش های طیف سنجی می توان به رزونانس مغناطیس هسته ای، مادون قرمز، فرابنفش، چرخش نوری، دو رنگ نمایی دورانی و تفرق اشعه ایکس اشاره نمود (۴۳). در این پژوهش دو مورد آخری مورد بررسی قرار نگرفته است اما سایر موارد در زیر تشریح می شوند.

۱-۱-۷-۳-۱- درجه چرخش نوری (پلاریمتری[1])

آرایش فضایی اتصالات گلیکوزیدی، با تعیین چرخش نوری ویژه محلول های گلیکوز امکان پذیر است. چرخش نوری نسبتا بالا در ساکاریدها (برابر یا بزرگتر از ۱۰۰ درجه)، نشان دهنده وجود تعداد زیادی اتصالات نوع آلفا و چرخش نوری نسبتا پایین (برابر یا کمتر از ۱۰ درجه)، نشان دهنده وجود تعداد زیادی اتصالات نوع بتا در ساختار است (۳۱).

۱-۱-۷-۳-۲- طیف سنج فرابنفش و مرئی

از نقطه نظر تاریخی، طیف سنجهای فرابنفش متداول قبل از طیف سنجهای مادون قرمز، رزونانس مغناطیس هسته ای و جرمی گسترش پیدا کرده اند. جذب تابش فرابنفش و یا مرئی توسط یک مولکول سبب انتقالاتی در ترازهای الکترونی آن مولکول می شود و به همین دلیل غالبا این روش طیف سنجی تحت عنوان مترادف طیف سنجی الکترونی نیز شناخته می شود. طیف سنجی فرابنفش بیشتر برای آن دسته از ترکیبات آلی به کار برده می شود که در ساختار خود دارای پیوندهای دوگانه (مزدوج) هستند. این دسته از پیوندها در اشعه فرابنفش بصورت رنگی نشان داده می شوند (۴۳).

توسط طول موجهای مختلف می توان طیف های جذبی مواد تشکیل دهنده گیاهان در محلول های بسیار رقیق را در برابر یک حلال شاهد توسط طیف سنج های نوری[2] خودکار ثبت کرد. جهت این هدف ابتدا نمونه مورد آزمایش در یک حلال مناسب حل می شود و نکته مورد توجه عدم جذب حلال انتخابی در محدوده مورد مطالعه است. سپس محلول حاوی نمونه در سلول یا محفظه شفاف قرار می گیرد.

1 Polarimetric
2 Spectrophotometer

استفاده از محفظه شیشه ای به هنگام کار با نور مرئی مناسب است ولی به علت جذب زیاد در ناحیه فرابنفش بهتر است سلولی از جنس کوارتز انتخاب شود. طیف جذبی ترکیبات فاقد رنگ در ناحیه بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر (مربوط به نواحی فرابنفش) و طیف جذبی ترکیبات رنگی در ناحیه بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر (مربوط به نواحی مرئی) اندازه گیری می شود (۴). بیشترین کاربرد استفاده از طیف سنجی فرابنفش و مرئی برای پلی ساکاریدها مربوط به تایید مراحل خالص سازی قبلی و اندازه گیری قند کل است. بصورت خلاصه می توان اشاره کرد که عدم جذب در ناحیه ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش، نشان دهنده این موضوع می باشد که ساختار پلی ساکارید فاقد پروتئین و اسیدهای نوکلوئیک است و عملکرد خوبی در مراحل خالص سازی قبلی وجود داشته است. جهت اندازه گیری میزان قند کل در پلی ساکاریدها از روش رنگ سنجی[1] استفاده می شود. در این روش پلی ساکاریدها در حضور فنل و اسید سولفوریک غلیظ رنگ زرد متمایل به نارنجی تولید می کنند که شدت رنگ حاصل در طول موج ۴۹۰ (برای هگزوزها) و ۴۸۰ نانومتر (برای پنتوزها و اسیدهای اورونیک) توسط طیف سنج نوری اندازه گیری می شود. با مقایسه میزان جذب حاصل از نمونه با منحنی های استاندارد حاصل از جذب نمونه های شاهد (مونوساکاریدهای استاندارد)، می توان میزان قند کل موجود در ساختار پلی ساکارید را بدست آورد (۲۲).

۱-۱-۷-۳-۳- طیف سنجی مادون قرمز

طیف مادون قرمز از جذب فرکانس‌های مادون قرمز توسط باندهای شیمیایی قابل ارتعاش ناشی می شود، از این رو طیف سنجی ارتعاشی نامیده می شود. محدوده جذب[2] طیف مادون قرمز یا انتشار[3] به عنوان یک تابع از فرکانس در محدوده ۴۰۰۰-۵۰ cm^{-1} قرار گرفته است. طیف مادون قرمز پلی ساکارید با مقدار ۱۰-۱ میلی گرم نمونه جامد امکان پذیر است. نمونه توسط مخلوط کردن با پتاسیم برمید یا مخلوط کردن با نوژول[4] (روغن پارافینی با جرم مولکولی بالا) آماده می شود. سپس نمونه های آماده شده در محفظه یا سلول های دستگاه مادون قرمز قرار می گیرد و اطلاعات بصورت پیک دریافت می شود. به طور کلی، مادون قرمز برای مشخص کردن گروه‌های عاملی و نیز برای اندازه‌گیری پیکربندی آنومری و الگوهای جانشینی استفاده می‌شود (۴۳).

۱-۱-۷-۳-۴- طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای

شکل دیگری از طیف سنجی جذبی، رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR) است که در واقع مکمل طیف سنجی فرابنفش و مادون قرمز است. همانطور که از نام آن مشخص است، NMR به خواص

1 Colorimetric
2 Absorption
3 Dissemination
4 Nujol

مغناطیسی هسته اتمهای معین به ویژه هسته اتم هیدروژن-پروتون و ایزوتوپ کربن، کربن-۱۳ مربوط می شود. مطالعه یک مولکول توسط طیف سنجی NMR این امکان را می دهد که اختلاف خواص مغناطیسی هسته های مختلف موجود در مولکول را ثبت کرده و موقعیت هر یک از این هسته ها در داخل مولکول مورد ارزیابی قرار گیرد. توسط این روش می توان تنوع هسته ها با موقعیت محیطی متفاوت در یک مولکول را پیش بینی کرد. همچنین می توان پی برد که چه اتمهایی در گروه های مجاور وجود داشته و تعداد اتمهای موجود در هر موقعیتی را نیز تعیین کرد (۴۷).

این روش برای مطالعه پلی ساکاریدها سریع، غیرمخرب، بدون تغییر و تخریب است. طیف کربن و پروتون NMR برای شناسایی ساختارهای پلی و الیگوساکاریدها بسیار مفید است. کربن NMR اطلاعات بیشتر در مورد ترکیب مونوساکارید، توالی و ترکیب پلی ساکاریدها می‌دهد و همچنین می‌تواند برای تعیین درجه خلوص مراحل آماده سازی پلی‌ساکارید استفاده شود (۴۳).

برای کسب این اطلاعات لازم است تا مقداری از جسم مورد آزمایش، در یک حلال خنثی و فاقد هیدروژن مانند آب سنگین (D_2O)، دوتریو کلروفرم ($CDCL_3$)، دوتریو استن (CD_3-C-CD_3) و غیره بصورت محلول درآید و در بین دو قطب مغناطیس دستگاه قرار داده شود و تغییرات بوجود آمده در نمونه توسط دستگاه NMR در مقایسه با جسم استاندارد (که یک جسم خنثی بوده و می توان آن را به جسم جدا شده اضافه کرد، بدون اینکه هیچ گونه واکنش شیمیایی با آن حاصل کند) به صورت یک سری خطوط یا پیک هایی با ارتفاع های متفاوت ثبت و مورد ارزشیابی قرار گیرد. تترا متیل سیلان[1] (TMS)، از متداولترین استانداردهای مورد استفاده برای NMR است که در حلال های آلی نظیر کلروفرم محلول است. اگر جسم مورد آزمایش در آب محلول باشد (مانند پلی ساکاریدها)، از ترکیب دیگری با نام DSS[2] یا نمک سدیم آن به عنوان استاندارد استفاده می شود. قابلیت انحلال DSS در آب بسیار بالاتر از TMS است (۴، ۴۷).

سه پارامتر قابل اندازه گیری توسط NMR، که در برگیرنده اطلاعاتی درباره توالی گلیکوزها است، عبارتست از:

۱- جابجایی شیمیایی[3] (δ بر حسب PPM): موقعیت پیک هسته رزونانسی را بسته به محیط های شیمیایی اطراف آن در ساختار مولکول، اندازه گیری می نماید.

1 Tetramethylsilane
2 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid
3 Chemical shift

۲- شدت سیگنال (ارتفاع پیک): تعداد هسته های رزونانسی را اندازه گیری می نماید و با انتگرال گیری از پیک ها حاصل می گردد.

۳- تعدد[1] پیکهای رزونانسی

چون پروتون ساده ترین هسته و اولین هسته ای است که پدیده NMR برای اولین بار در آن مشاهده شده است بهترین نقطه شروع برای بررسی NMR، ارزیابی NMR پروتون است. دو نوع پروتون (پروتون متصل شده به اتمهای کربن و متصل شده به اتمهای اکسیژن) جهت مطالعه NMR پروتون گلیکوزها موجود است. پروتون های هیدروکسیلی (متصل به اتم اکسیژن)، بعلت تولید سیگنالهای پهن تغییرپذیر در جابجایی شیمیایی و قابلیت راحتی تبادل در محلول های آبی، برای تعیین ساختار مناسب نیست. پروتون های متصل به کربن های ۲ تا ۶ نسبت به پروتون متصل شده به کربن آنومری (کربن شماره ۱) دارای قابلیت حفاظت بیشتری هستند. بدلیل پیچیدگی NMR پروتون الیگو و پلی ساکاریدها، معمولا تجزیه و تحلیل طیف کامل NMR پروتون، لزومی ندارد و محققین بیشتر ناحیه آنومری (۴/۵-۶/۵ PPM) را که شامل سیگنالهای مهمی است مورد ارزیابی قرار می دهند (۳۱).

طیف NMR کربن کربوهیدراتها شامل اطلاعات سودمندی در ارتباط با ساختار الیگو و پلی ساکاریدهاست. در این طیف یک سیگنال مجزا برای هر نوع بخصوص از کربن های حاضر، وجود دارد. به عبارت دیگر کربن های متنوع، سیگنالهای جداگانه ای را، که مشخصه ساختاری آنهاست، در این طیف نشان می دهند. عموما سیگنالهای کربن شماره ۱، مربوط به اتصالات گلیکوزیدی نوع آلفا و بتا، به ترتیب در نواحی بین ۹۹-۱۰۲ و ۱۰۲-۱۰۵ ppm ظاهر می شود (۳۱).

۱-۱-۷-۳-۵- طیف سنجی جرمی

طیف سنجی جرمی بر این اصل استوار است که یون ها دارای نسبت های جرمی متفاوتی هستند. نسبت های بار الکتریکی (m/z) جدا از هم هستند زیرا آنها به طور متفاوتی توسط حوزه های الکترواستاتیک و مغناطیسی منحرف می‌شوند. سه مرحله مهم برای تجزیه و تحلیل ترکیبات توسط طیف سنجی جرمی وجود دارد: الف) آماده سازی نمونه; ب) تبخیر ج) یونیزاسیون. در روش های یونیزاسیون قدیمی تر، نمونه ها در صورت غیر فرار بودن باید ابتدا به محصولات استیله شده فرار یا آلکیله شده تبدیل شوند.

دو روش مهم یونیزاسیون، که عموما مورد استفاده قرار می گیرند یونیزاسیون الکترون (EI)[2] و یونیزاسیون شیمیایی (CI)[3] هستند. در یونش الکترون، یونی که بطور طبیعی تشکیل شده ممکن است

1 Multiplicity
2 Electron ionization
3 Chemical ionization

قبل از ورود به تحلیل‌گر، به دلیل انرژی بالا توسط بمباران الکترون ها قطعه قطعه شود و طیف پیچیده ای حاصل شود. این روش برای تعیین جرم مولکولی و توالی ملکولهایی زیستی مانند پپتیدها، پروتئین های کوچک، گلیکولیپیدها و الیگوساکاریدها استفاده شده است (۴۳).

۱-۲- گیاه چوبک[1]

۱-۲-۱- مقدمه

چوبک[2]، به زبان آذری چوغان، عبارت است از ریشه های سخت و استخوانی با پوسته ضخیم دارای شیارهای طولی به رنگ متمایل به زرد و قسمت داخلی سفید رنگ که طعمی تلخ دارد و چنانچه در آب قرار گیرد در اثر حرکت شدید ایجاد کف غلیظ می کند. چوبک گیاهی وحشی است که در همه جا قابلیت رشد دارد (۱). و ریشه مهمترین قسمت این گیاه است (۲،۱). بقراط حکیم، چوبک را برای افزایش ترشحات ادرار و رفع سنگینی شکم تجویز می‌کرد. سایر پزشکان از چوبک در درمان سرفه، بیماریهای کبدی، سنگ مثانه، بیماریهای پوستی و از بین بردن جوش پوست و دمل استفاده کرده اند (۱۰).

قبلا از ریشه تعدادی از گیاهان به علت داشتن ساپونین جهت شستن و تمیز کردن لباس به عنوان صابون استفاده می شده است. این گیاهان از خانواده میخک[3] هستند. چوبک آنهایی هستند که به صورت درختچه و ریشه ضخیمی دارند و بیشتر در ایران رشد می کنند و برخی دیگر که یکساله و چندساله ولی علفی هستند از جنس گیاه صابونی[4] هستند که بیشتر در اروپا رشد می کنند. البته دسته دوم نیز در ایران به ندرت یافت می شود.

در حالت کلی این گونه گیاهان به فارسی در نواحی مختلف ایران با اسامی «چوبک»، «چوبک اشنان»، «چوبه» و «آذربو»، در همدان به اصطلاح محلی «اسپرون»، در آذربایجان و کردستان «چوغان» و در سایر مناطق «فلار» و «گلیم شوی» نامیده می شوند. در کتب طب سنتی با نامهای عربی «غاسول»، «عرطنیثا»، «صابونیه»، «عرطنیثه» (بیخ گیاه) و «سطرونیون» از آن ها نامبرده می شود. به فرانسوی به آن Saponaire و به انگلیسی به آن Soapwort می گویند (۹).

همانطور که قبلا ذکر شد ریشه بخش اصلی مورد استفاده این گیاه است که پس از خارج شدن از قسمت های عمیق زمین، قطعه قطعه شده و در سایه آفتاب خشک می شود. روش برداشت ریشه این گیاه کاملا سنتی است و معمولا توسط اهالی و روستاییان منطقه با استفاده از تیشه و بیل انجام می شود. هر ساله مقادیر زیادی از ریشه گیاه چوبک، بوسیله بخش خصوصی به کشور های همسایه، عمدتا ترکیه،

1 *Acanthophyllum* C.A.Mey
2 Chubak
3 Caryophyllaceae
4 Saponaria

صادر می شود که بیشترین استفاده آن برای تولید حلوا است و خاصیت رنگبری آن دلیل کاربرد ریشه گیاه مذکور می باشد. به تازگی بازار صادرات گیاه چوبک دچار رکود شده است که علت اصلی آن صادرات به صرفه تر ریشه گیاه مذکور از کشور افغانستان است.

۱-۲-۲- خصوصیات اکولوژیکی و تاکسونومی گیاه

جنس چوبک جزو خانواده میخک تلقی می شود و تاکنون ۶۱ گونه از این جنس شناسایی شده است. این جنس در ایران ۳۲ گونه گیاه بوته ای اغلب پشته ای دارد که در مناطق کوهستانی و بیابانی رشد می کند، گونه های انحصاری آن شامل چوبک کپه ای[۱]، چوبک سفید[۲]، چوبک خوزستانی[۳]، چوبک بیابانی[۴]، چوبک هزار مسجدی[۵]، چوبک قوچانی[۶]، چوبک پشته ای[۷]، چوبک کرک غده ای[۸] و چوبک ترکمنستانی[۹] است و دیگر گونه های آن علاوه بر ایران در ترکمنستان، پاکستان، عراق، تالش، قفقاز، افغانستان و آسیای مرکزی رشد می کنند (۷).

طبق بررسی های پیشین بیشترین تعداد گونه ثبت شده از این گیاه متعلق به استان خراسان و نواحی همجوار مانند ترکمنستان و افغانستان است (۴۶، ۴۹).

گونه هایی که در ایران بیشترین کاربرد را دارند عبارتند از چوبک تماشایی (چوبک برگه دار)[۱۰]، چوبک بیابانی، چوبک کرک غده ای، چوبک نازک (چوبک شکننده)[۱۱]، چوبک بوته ای (چوبک ایرانی)[۱۲] و چوبک چوبک زبر[۱۳] (۶). موسم گل دهی آن خرداد و تیر ماه است و در مناطق مختلفی از ایران از جمله البرز، بین جابون و فیروز کوه، شرق، خراسان، شمال شرقی مثل دامغان، سمنان، شاهرود، گردنه بشم و کوه بیزک و غرب مثل ارتفاعات الوند، کوه چکاپ و انجادان یافت می‌شود (۶).

از نظر پراکنش جغرافیایی، چوبک در اکثر نقاط ایران، خصوصا نواحی کوهستانی و بیابانی می روید. از مجموع مراتع ایران، جنس چوبک در ۷۲۹,۳۵۸ هکتار به عنوان جنس غالب معرفی شده است (۳).

همانطور که در بالا ذکر شد چوبک نکائی (کرک غده ای) یکی از رایجترین گونه های مصرفی در ایران است که در این پژوهش نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

۱-۲-۳- مشخصات ظاهری گیاه

1 *A. Pachycepalum*
2 *A. Leucostegium*
3 *A. khuzistanicum*
4 *A. Crassifolium*
5 *A. chloroleucum*
6 *A. Anderesenii*
7 *A. caespitosum*
8 *A. Adenphorum*
9 *A. brevibracteatum*
10 *A. bracteatuum*
11 *A. gracilis*
12 *A. microcephalum*
13 *A. squarrosum*

ساقه های چوبک متعدد و کلفت است و کمی کرک دارد و ارتفاع آن از چهل تا هفتاد سانتیمتر می رسد. ریشه های چوبک که خزنده و طویل است در خارج خاک به رنگ قرمز قهوه ای و در داخل خاک به رنگ زرد لیمویی است و کلفتی آن به اندازه انگشت دست است. برگ های چوبک، بزرگ، نوک تیز، بیضی شکل و مثل سرنیزه است و دارای سه یا پنج رگه است. گل های چوبک در مرداد ماه ظاهر می شود و تا مهر ماه دوام می آورد و به شکل خوشه در آخر ساقه ها پدیدار می شود (۱۰).

چوبک گیاهی تیغ دار یا کوسنی شکل بوده دارای گل های سفید رنگ و فراوان در انتهای شاخه ها است (۱). گونه چوبک نکائی گیاهی پایا، دارای بوته های کوچک چوبی، نیمه کروی، بالشک مانند و متراکم می باشد. ساقه این گیاه چوبی، متعدد، منشعب از قاعده، با شاخه های ساده، منتهی به یک گل آذین کپه مانند و کروی است. برگ های این گیاه ایستاده-گستره، درفشی، در سطح رو مسطح، در سطح پشتی محدب، در انتها سخت و تیز و خاری شده هستند. گل های این گیاه سفید یا متمایل به سفید، مجتمع در گل آذین سر مانند یا کروی منفرد یا در دسته های ۳-۲ تایی نزدیک هم و به صورت توده ای کروی و متراکم، دمگل کوتاه و ضخیم، براکته ها پهن دراز، چسبناک، کاسه چسبناک، پهن دراز-استوانه ای، با دندانه های مثلثی و نوکدار، گلبرگها پهن دراز-چمچمه ای، در انتها مدور و بلندتر از کاسه هستند (شکل ۱-۱۰) (۶).

شکل ۱-۱۰: نمایی ظاهری اندام های هوایی چوبک نکائی به همراه گل آن (۶).

۱-۲-۴- ترکیبات شیمیایی

برگ های چوبک و ریشه های آن سرشار از ساپونین است. ساپونین یک ماده شیمیایی است که مشابه صابون است و ایجاد کف می‌کند. چوبک دارای هیدرات کربن، رگه هایی از مواد چربی، لکتونین و گلوتامین است. ریشه های چوبک علاوه بر این مواد دارای رزینی به رنگ قهوه ای است و مواد سقزی و آلبومین دارد (۱۰). ریشه های چوبک دارای مزه ای کمی تلخ و حاوی ساپونین های تری ترپنوئیدی

است (۲). از نظر ترکیبات شیمیایی در ریشه گیاه چوبک موادی نظیر ساپونین و کربوهیدرات وجود دارد (۹).

۱-۲-۵- موارد مصرف و کاربردهای چوبک

برای کاربرد این گیاه ابتدا باید ریشه عمیق گیاه از زمین خارج و پس از قطعه قطعه شدن در سایه آفتاب خشک شود. سپس بسته به نوع مصرف آزمایشات مختلفی بر روی آن صورت گیرد. چوبک به عنوان شستشو دهنده مصرف سنتی دارد (۱). باید ساقه های چوبک را از خرداد ماه تا شهریور ماه قطع کرد و برگ های آن را یکی یکی کند و در سبدی که هوا خور باشد و در جایی که هوا عبور می کند گذاشت تا با سرعت خشک شود. ریشه های چوبک را باید در ماه های پاییز و زمستان از خاک در آورد و با آب شست و با پارچه ای خشک کرد و سپس به قطعات سه تا شش سانتیمتری برید و در جهت طول، آنها را در سبدی گذاشت و خشک کرد. قدیمی ها چوبک را می شناختند. دیوسکورید درباره چوبک این طور نوشته است: چوبک را اگر با عسل مخلوط کنید دوای موثر سرفه و بیماریهای کبدی است، چوبک سنگ مثانه را نیز دفع می کند. پلین، پماد چوبک را برای بیماریهای پوستی و از بین بردن جوش پوست و دمل مفید و موثر می دانست و چوبک را در آرد جو و سرکه خمیر می کرد و از آن مرهمی می ساخت. جوشانده چوبک به عنوان مسهل تصفیه کننده، در درمان بحران کبدی، رماتیسم و یا نقرس شدید کاربرد دارد. این جوشانده همچنین در مورد گریپ، ورم عضلات و سرفه، بیماری زونا و چاقی مصرف می شود. برای استعمال خارجی، جوشانده چوبک را می توان به عنوان دوای غرغره برای انواع آنژین و محلول شست وشو برای جرب و زونا (تاولهای پوست) به کار برد (۱۰).

در ایران به صورت سنتی آن را به عنوان صابون (شستشو دهنده) و در تهیه برخی از فرآورده های غذایی مانند حلوا ارده به کار می‌برند (۲). ریشه این گیاه از نظر طبیعت گرم و خشک است و اثرات داروئی فراوانی در کتب پزشکی قدیمی از آن ثبت شده است که مربوط به ریشه آن است. گفته شده است که ریشه آن تحریک کننده نیروی جنسی است. چوبک بسیار عطسه آور است و برای تسکین سکسکه از آن استفاده می شود. مدر و قاعده آور بوده و برای دفع سنگ مثانه سودمند است. قطره دم کرده آن را اگر در بینی بریزیم بسیار عطسه آور است و در موارد زکام برای باز کردن مجاری گرفته شده بسیار موثر می باشد. برای تسکین درد سیاتیک و ورم طحال ضماد آن با سرکه نافع است و اگر در محلول تنقیه داخل گردد، تنقیه آن برای اشخاص مبتلا به سیاتیک، داروی مسکن خوبی است. ضماد خاکستر ریشه آن با سرکه جهت درد مفاصل و سیاتیک نافع می باشد. گرد آن را اگر بر روی زخم های بد بپاشیم برای التیام درد مفید است (۵، ۹).

از کاربردهای صنعتی ریشه این گیاه می توان به استفاده از آن در کارخانجات صنایع غذایی (بخصوص حلوا سازی) برای بی رنگ کردن شربت قندی مورد استفاده اشاره کرد. تصور بر این است که هر ساله

برخی از تجار ایرانی ریشه گیاه ذکر شده را به کشور های اروپایی مانند آلمان (برای تولید شوینده های طبیعی در مقایسه با شوینده های سنتزی رایج) صادر می کنند اما متاسفانه آمار صحیحی در این مورد موجود نیست.

جدیدا برخی از محققان ایرانی برای تولید شامپوهای گیاهی و نیز انگل زدایی سبزی های خوردنی در مقایسه با ضدعفونی کننده ها و پاک کننده های تجاری کاربرد عصاره ریشه گیاه چوبک را مورد بررسی قرار داده و به نتایج قابل قبولی نیز دست پیدا کرده اند اما هنوز استفاده از ریشه گیاه ذکر شده برای رسیدن به اهداف بالا قابلیت کاربرد صنعتی ندارد (۱۱).

چوبک نکائی (کرک غده ای)[1] از رایج‌ترین گونه‌های چوبک در ایران است که در ارتباط با ساختار پلی ساکاریدهای تشکیل دهنده آن مطلبی منتشر نشده است. این گونه چوبی، چند ساله، دارای برگهای ایستاده – گستره، درفشی، در سطح رو مسطح، در پشتی محدب، در انتها سخت و تیز و خاری شده است. موسم گل دهی آن خرداد و تیر ماه است و در مناطق مختلفی از ایران از جمله البرز، شرق، شمال شرقی مثل شاهرود و غرب مثل الوند یافت می‌شود (۶). ریشه های آن سرشار از مواد قندی و ساپونین است. این گونه دارای کربوهیدرات، چربی و پروتئین است. علاوه بر مواد ذکر شده ریشه حاوی مواد رزینی به رنگ قهوه ای و مواد سقزی است. از کاربردهای آن می توان به استفاده آن در صنایع حلوا سازی اشاره کرد (۱۰).

1 *A. glandulosum*

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱- استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها

همانطور که قبلا اشاره شد استخراج و خالص سازی مواد از گیاهان از قدیم الایام معمول بوده و به مرور زمان تکامل یافته است بطوریکه امروزه روش های اختصاصی برای استخراج و خالص سازی هر کدام از ترکیبات موجود در مواد گیاهی در دسترس است. انتخاب روش استخراج به نوع پلی ساکارید جدا شده بستگی دارد. در زیر شرح مختصری بر انواع روش های استخراج که برای جداسازی پلی ساکاریدها از گیاهان مختلف بوسیله پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته، ارائه شده است.

هو[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی ساکارید محلول در آب ساقه های درختان براکیپوس اکانتوپاناکس[۲] را با استفاده از آب داغ با دمای ۸۰°C استخراج کردند. خالص سازی پلی ساکارید مذکور توسط دی-اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و کروماتوگرافی ژل تراوا انجام شد (۳۳).

زای[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۵ توسط آب با دمای ۱۰۰°C پلی ساکاریدهای محلول در آب برگ های مگالوفیلا آمپلوپسیس[۴] را استخراج کردند. خالص سازی پلی ساکاریدها توسط ستون های دی‌اتیل-آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد (۵۹).

گوا[۵] و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای ریشه های گیاه جینسنگ امریکایی[۶] را با استفاده از آب با دمای ۸۰°C استخراج کردند (۲۹).

لی[۷] و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی ساکاریدهای محلول در آب ساقه گیاه دندروبیوم هوشاننز[۸] را توسط آب با دمای ۵۵°C استخراج کردند. برای خالص سازی پلی ساکارید در این تحقیق از ستون دی‌اتیل-آمینواتیل سلولز استفاده شد (۳۸).

زانگ[۹] و همکاران در سال ۲۰۱۵ دو بخش پلی‌ساکاریدی محلول در آب را از ریشه‌های گیاه کیوی[۱۰] توسط آب با دمای ۸۰°C استخراج کردند. خالص سازی پلی ساکاریدها توسط ستون های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفارسیل اس-۳۰۰ انجام شد (۶۸).

یانگ[۱۱] و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از آب داغ با دمای ۸۰°C به استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از سیب زمینی شیرین چینی[۱۲] پرداختند. فرایند خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی سریع جریان معکوس و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد و در نهایت پلی‌ساکارید خالص حاصل شد (۶۱).

---

1 Hu
2 *Acanthopanax brachypus*
3 Xie
4 *Ampelopsis megalophylla*
5 Guo
6 American ginseng
7 Li
8 *Dendrobium huoshanense*
9 Zhang
10 *Actinidia Chinensis*
11 Yang
12 *Chinese yam*

یو[1] و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی‌ساکارید محلول در آب موجود در میوه‌های تریکولما مونگلیکوم ایمای[2] را توسط روش ترکیبی مایکروویو-اولتراسونیک با دمای ۵۰°C استخراج کردند. برای خالص‌سازی این پلی‌ساکارید از دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ استفاده شد (۶۵).

جیا[3] و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از آب داغ ۸۹°C پلی‌ساکاریدهای محلول در آب برگ‌های گیاه چای هاوک[4] را استخراج کردند. فرایند خالص‌سازی با استفاده از دی‌اتیل‌آمینو اتیل‌سلولز-۵۲ انجام شد و در نهایت پلی‌ساکارید خالص شده حاصل شد (۳۵).

یو و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از آب داغ با دمای ۹۰°C و اولتراسونیک با دمای ۶۰°C به استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از قارچ خوراکی بولتوس ادولیس[5] پرداختند. فرایند خالص‌سازی با استفاده از دی‌اتیل‌آمینو اتیل‌سلولز-۵۲ و سفادکس جی-۷۵ انجام شد و در نهایت پلی‌ساکارید خالص حاصل شد (۶۴).

هی[6] و همکاران در سال ۲۰۱۴ چهار پلی‌ساکارید محلول در آب از میوه بالنگ انگشتی[7] با استفاده از آب جوش و اتانول استخراج کردند. براساس منحنی کالیبراسیون، وزن مولکولی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده ۱۱۳,۹، ۳۲,۶، ۱۴۰,۳، ۱۷۷,۱ کیلودالتون تخمین زده شد (۳۰).

چن و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از آب داغ ۹۰°C پلی ساکاریدهای محلول در آب ریشه های گیاه افیوپجون ژاپنی[8] را استخراج کردند. فرایند خالص سازی توسط دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد و در نهایت پلی ساکارید خالص حاصل شد (۲۰).

هو[9] و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از آب در دمای اتاق و دی اتیل آمینو اتیل سفاروز به استخراج و خالص سازی یک گالاکتومانان جدید از ریشه های سریش آنیسوپتروس[10] پرداختند (۶۹).

لو[11] و همکاران در سال۲۰۱۰ با استفاده از آب جوش پلی ساکاریدهای محلول در آب ساقه گیاه دندروبیوم نوبیله[12] را استخراج کردند. سپس فرایند خالص سازی با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس جی-۲۰۰ انجام شد (۷۰).

سون[13] و همکاران در سال۲۰۱۰ برای استخراج و خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب از ریشه های گیاه بوپلوروم چیننزه[14] به ترتیب از آب داغ ۸۰°C و دی‌اتیل‌آمینواتیل سفاروز همراه با سفارسیل اس-۲۰۰[15] استفاده کردند (۵۲).

1 You
2 *Tricholoma mongolicum Imai*
3 Jia
4 *Hawk tea*
5 *Boletus edulis*
6 He
7 *Finger citron fruits*
8 *Ophiopogon Japanese*
9 Hu
10 *Eremurus anisopterus*
11 Luo
12 *Dendrobium nobile*
13 Sun
14 *Bupleurum chinense*
15 Sephacryl S-200

زای[1] و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از آب داغ ۸۰°C ، پلی ساکارید محلول در آب جدیدی را از برگهای گیاه سیکلوکاریا پالیوروس[2] استحصال کردند. خالص سازی پلی ساکارید مذکور با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل سفادکس و سفارسیل اس-۴۰۰ انجام شد (۵۸).

یین[3] و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از آب داغ ۹۰°C پلی ساکارید محلول در آب جدیدی از ریشه های گیاه تاکسوس یونانینسیس[4] استخراج کردند. فرایند خالص سازی این پلی ساکارید توسط دی اتیل آمینو اتیل سلولز-۵۲ و سفارسیل اس-۱۰۰ انجام شد و در نهایت پلی ساکارید خالص حاصل شد (۶۳).

وانگ[5] و همکاران در سال ۲۰۱۰ پلی ساکارید محلول در آب قارچ کردیسپس سیننسیس[6] را با استفاده از آب داغ ۹۰°C استخراج و برای خالص سازی آن از دی اتیل آمینو اتیل سلولز-۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ استفاده کردند (۵۵).

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی از میوه گیاه کراتائگوس پیناتیفیدا[7] توسط لی[8] و همکاران در سال ۲۰۰۹ استحصال شد. این محققین از آب جوش و دی اتیل آمینو اتیل سفاروز برای استخراج و خالص سازی پلی ساکارید استفاده کردند (۳۹).

زانگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از آب جوش و دی اتیل آمینو اتیل سلولز همراه با سفادکس جی-۷۵، پلی ساکاریدهای محلول در آب ریشه های گیاه پاناکس جینسنگ[9] را استخراج و خالص سازی کردند (۶۹).

پلی ساکارید موجود در قارچ کردیسپس میلیتاریس[10] با استفاده از سود ۰/۳ مولار در دمای ۵۵°C توسط یو و همکاران در سال ۲۰۰۹ استخراج شد. محققین برای انجام فرایند خالص سازی از دی‌اتیل-آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفارسیل اس-۱۰۰ استفاده کردند (۶۶).

پلی ساکاریدهای محلول در آب برگهای گیاه تاکسوس چایننسیس[11] توسط وو[12] و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از آب جوش، استخراج شد. فرایند خالص سازی پلی ساکاریدهای مذکور با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یون و غربال مولکولی انجام شد. نتایج آنها نشان داد که پلی ساکاریدهای خالص شده از نوع اسیدی و هترو هستند (۵۷).

پلی ساکارید موجود در ریشه های گیاه دیسکورآ نیپونیکا[13] با استفاده از آب ۹۰°C و دی اتیل آمینو اتیل سفاروز همراه با سفادکس جی-۱۰۰ توسط لو[14] در سال ۲۰۰۸ استخراج و خالص سازی شد (۴۱).

---

1 Xie
2 *Cyclocarya paliurus*
3 Yin
4 *Taxus yunnanensis*
5 Wang
6 *Cordyceps sinensis*
7 *Crataegus pinnatifida*
8 Li
9 *Panax ginseng*
10 *Cordyceps militaris*
11 *Taxus chinensis*
12 Wu
۱۳ *Dioscorea nipponica*
۱۴ Luo

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی از ریشه های گیاه دیسکورا اپوزیتا[1] با استفاده از آب سرد توسط زائو[2] و همکاران در سال ۲۰۰۵ حاصل شد. فرایند خالص سازی پلی ساکارید با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل سلولز-۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد (۷۰).

دوآن[3] و همکاران در سال ۲۰۰۳ پلی ساکارید محلول در آب جدیدی از برگهای گیاه دیوسپیروس کاکی[4] با استفاده از آب داغ با دمای ۸۰°C استخراج کردند. برای خالص سازی پلی ساکارید استخراج شده در این تحقیق از دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز همراه با سفارسیل اس-۳۰۰ استفاده شد (۲۳).

در ارتباط با پلی ساکاریدهای ریشه گیاه چوبک تحقیقات بسیار کمی انجام شده و تنها مطالعات صورت گرفته مربوط به چهار گونه افغانستانی، خراسانی، نورینجیانوم[5] و تماشایی[6] است.

آریفخودزائف[7] در سال ۱۹۹۷ پلی ساکاریدهای موجود در بخش‌های هوایی و زمینی چوبک افغانستانی[8] را با استفاده از آب در دمای اتاق استخراج نمودند. آنها برای خالص سازی پلی ساکاریدها از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز استفاده کردند (۱۲).

آریفخودزائف و همکاران در سال ۱۹۹۹ پلی ساکاریدهای اندام های هوایی و زمینی چوبک نورینجیانوم[9] را توسط آب در دمای اتاق استخراج و برای خالص سازی پلی ساکاریدها موجود از ستون دی‌اتیل‌آمینو-اتیل سلولز استفاده کردند (۱۳).

کوربانوا[10] و همکاران در سال ۲۰۰۲ پلی ساکاریدهای حاصل از گیاه چوبک نورینجیانوم را مجددا با همان روش استخراج و خالص سازی توسط آریفخودزائف و همکاران در سال ۱۹۹۹ مورد بررسی قرار دادند (۳۷).

کوربانوا و همکاران در سال ۲۰۰۳ گونه چوبک خراسانی[11] را توسط آب در دمای اتاق استخراج و توسط ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز خالص سازی کردند (۳۶).

جهان بین[12] و همکاران در سال ۲۰۱۱ پلی ساکاریدهای حاصل از ریشه‌های گونه چوبک تماشایی را مورد بررسی قرار دادند. استخراج پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از آب گرم با دمای ۵۰°C انجام گرفت و خالص سازی پلی ساکارید موجود توسط ستون‌های دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد (۳۴).

1 *Dioscorea opposita*
2 Zhao
3 Duan
4 *Diospyros kaki*
5 *knorringianum*
6 *bracteatum*
7 Arifkhodzhaev
8 Pungens
9 Knorringianum
10 Kurbanova
11 Borszczowii
12 Jahanbin

۲-۲- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها

شناسایی ساختار ترکیبات جدید موجود در منابع طبیعی، علی‌رغم دشواری و زمان بر بودن، از زمانهای قدیم مورد توجه پژوهشگران بوده و تا به امروز از اهمیت آن کاسته نشده است. مقالاتی که هر ساله در مورد شناسایی این ترکیبات در مجلات تخصصی معتبر چاپ می شود گویای این حقیقت است.

لی[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی ساختار و فعالیت زیستی پلی‌ساکارید استخراج شده از ساقه گیاه دندروبیوم هوشاننز[۲] تحقیق کردند. مونوساکاریدهای تشکیل دهنده این پلی‌ساکارید گلوکز، آرابینوز، مانوز و رامنوز به ترتیب با نسبت‌های ۱۳/۸: ۳: ۶/۱: ۲/۱ بود. وزن مولکولی پلی ساکارید ۲۳۲ کیلو دالتون بود و طیف سنج فرابنفش نشان داد که پلی ساکارید فاقد پروتئین و نوکلئیک اسید می باشد. نتایج طیف سنج جرمی پلی ساکارید متیله شده نشان داد که گلوکز، مونوساکارید غالب در زنجیره اصلی است. واحدهای سازنده شاخه های جانبی آرابینوز، مانوز و رامنوز بود و محل اتصالات شاخه های جانبی به زنجیره اصلی از محل کربن شماره ۳ مانوزهای زنجیره اصلی است (۳۸).

چن[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی بهینه سازی استخراج، توصیف صفات اختصاصی اولیه و فعالیت ایمنی پلی‌ساکارید انجیرهای مختلف تحقیق کردند. برای استخراج از آنزیم‌های مختلف و برای خالص‌سازی از دی‌اتیل‌آمینواتیل سفاروز و سفادکس جی -۲۰۰ استفاده کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که دو نوع پلی ساکارید پس از خالص سازی حاصل شدند. پلی ساکارید های حاصله دارای واحدهای رامنوز، آرابینوز، زایلوز، مانوز، گلوکز و گالاکتوز با اوزان مولکولی ۱۵۲۰ و ۴۷۵ کیلو دالتون بودند (۱۹).

زانگ[۴] و همکاران در سال ۲۰۱۵ دو بخش پلی‌ساکاریدی محلول در آب از ریشه‌های گیاه کیوی[۵] را استخراج و خالص سازی کردند. وزن مولکولی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده ۵۵۸ و ۱۲۳۰ کیلو دالتون تخمین زده شد. واحدهای سازنده پلی ساکاریدهای خالص رامنوز، آرابینوز، زایلوز، مانوز و گالاکتوز با نسبت های مولی به ترتیب ۱/۴۸: ۴/۲۸: ۴/۳۰: ۱/۰۰: ۱۷/۸۳ بودند (۶۸).

1 Li
2 *Dendrobium huoshanense*
3 Chen
4 Zhang
5 *Actinidia Chinensis*

سدوی[1] و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی‌ساکارید محلول در آب موجود در گیاه مونوستروما اکسیسپرموم[2] را استخراج و خالص‌سازی کردند. مونوساکاریدهای تشکیل دهنده این پلی‌ساکارید رامنوز، فروکتوز، گالاکتوز، گزیلوز و گلوکز بود. وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ۵۵ کیلودالتون بدست آمد. شکل کنفورماسیونی پلی ساکارید توسط طیف سنج NMR آنالیز شد و نشان داد که اشکال بتا گالاکتوز با اشکال آنهیدرو گالاکتوز و سولفاته گالاکتوز پیوند برقرار کرده است (۴۹).

چنگ[3] و همکاران در سال ۲۰۱۳ استخراج و خالص سازی پلی ساکارید های محلول در آب موجود در گیاه اکیومیناتیوم اپیمدیوم[4] را بررسی کردند. راندمان استخراج پلی ساکارید ۸/۲۳٪ بود و وزن مولکولی پلی ساکاریدهای موجود ۱۳۸ کیلو دالتون و ۱۱۴ کیلو دالتون گزارش شد. نتایج آنها نشان داد که پلی ساکاریدها از واحد های مونومری گلوکز، مانوز و گالاکتوز تشکیل شده اند. طیف سنج FT-IR نشان داد که پلی ساکاریدهای موجود حاوی گروه های هیدروکسیل و پیوندهای C-H، C-O-C و C-O-H هستند (۲۱).

زانگ[5] و همکاران در سال ۲۰۱۲ پلی ساکارید محلول در آب موجود در پوست میوه ولیوتیپس فلامولینا[6] را استخراج و خالص سازی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که پلی ساکارید دارای وزن مولکولی ۱۳ کیلو دالتون است و از واحد های مونوساکاریدی فوکوز، مانوز، گلوکز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت های مولی ۱/۱۶: ۰/۸۲: ۱: ۳/۰۸ تشکیل شده است. استفاده از طیف سنج NMR و روش های آنالیز شیمیایی مانند متیله کردن مشخص کرد که پلی ساکارید موجود حاوی پیوند آلفا ۱ به ۶ دی گالاکتوپیرانان با انتهای فوکوزیل است (۶۷).

چن و همکاران در سال ۲۰۱۱ پس از بررسی پلی ساکارید محلول در آب حاصل از ریشه های گیاه افیوپجون ژاپنی[7] دریافتند که پلی ساکارید مذکور متشکل از واحدهای مونوساکاریدی آرابینوز، گلوکز و گالاکتوز با نسبت های مولی ۸:۱۶:۱ است. نتایج بدست آمده از طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که تمامی واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده پلی ساکارید به شکل پیرانوز هستند. وزن مولکولی پلی ساکارید بدست آمده ۳۵/۲ کیلودالتون بود و نتایج طیف سنج جرمی پلی ساکارید متیله شده نشان داد که گلوکز، مونوساکارید غالب در زنجیره اصلی است. واحدهای سازنده شاخه های جانبی گلوکز و گالاکتوز و محل اتصالات شاخه های جانبی به زنجیره اصلی از محل کربن شماره ۴ گلوکزهای زنجیره اصلی است. در نهایت نتایج آنها نشان

1 Seedevi
2 *Monostroma oxyspermum*
3 Cheng
4 *Epimedium acuminatum*
5 Zhang
6 *Flammulina velutipes*
7 *Ophiopogon Japanese*

داد که شاخه های جانبی متصل شده به زنجیره اصلی بوسیله گالاکتوز، گلوکز و آرابینوز پایان می‌یابد. این پژوهشگران در تحقیقات خود از طیف سنج NMR استفاده نکردند و اطلاعاتی در مورد نوع کنفورماسیون (آلفا یا بتا) قندهای سازنده پلی ساکارید ارائه ندادند (۲۰).

هو[1] و همکاران در سال ۲۰۱۱ گالاکتومانان حاصل از ریشه های سریش آنیسوپتروس را بررسی کردند و نشان دادند که گالاکتومانان حاصل دارای وزن مولکولی ۶ کیلودالتون است. با استفاده از طیف سنج مادون قرمز و NMR همراه با روش های آنالیز شیمیایی نظیر متیله کردن، اکسیداسیون پریودات و شناسایی واحدهای مونوساکاریدی سازنده با کروماتوگرافی روی کاغذ مشخص شد که گالاکتومانان حاصل از نوع خطی است و نسبت مانوز به گالاکتوز، ۳ به ۱ است. همچنین اتصالات موجود در ساختار از نوع آلفا ۱ به ۲ و آلفا ۱ به ۶ است و گالاکتوز و مانوز به شکل حلقه های پیرانوزی در ساختار گالاکتومانان وجود دارند (۳۲).

با مطالعه پلی ساکاریدهای محلول در آب ساقه گیاه دندروبیوم نوبیله، لو و همکاران در سال ۲۰۱۰ به این نتیجه رسیدند که ساقه گیاه مذکور حاوی چهار نوع پلی ساکارید با اوزان مولکولی ۱۳۶، ۲۷/۷، ۱۱/۸ و ۱۱/۴ کیلودالتون است. آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید نشان داد که مانوز، گالاکتوز و گلوکز مونوساکاریدهای غالب هر چهار نوع پلی ساکارید هستند و مقادیر کمی از مونوساکاریدهای رامنوز، آرابینوز و زایلوز نیز در آنها وجود دارند. اختلاف چهار پلی ساکارید ذکر شده در مقادیر کمی واحدهای مونوساکاریدی سازنده است. بعلاوه نتایج طیف سنج مادون قرمز پلی ساکاریدها نشان داد که نحوه کنفورماسیون واحدهای مونوساکاریدی در سه پلی ساکارید از نوع آلفا پیرانوز و در چهارمی از نوع بتا پیرانوز است. این پژوهشگران جزئیات دقیق تر و بیشتری از ساختار چهار پلی ساکارید ذکر شده ارائه نکردند (۴۰).

سون و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی پلی ساکارید محلول در آب ریشه های گیاه بوپلوروم چیننزه نشان دادند که آرابینوز، گالاکتوز و گلوکز واحدهای سازنده این پلی ساکارید به ترتیب با نسبت های مولی ۵/۱، ۲/۲ و ۱ هستند. وزن مولکولی پلی ساکارید ۲۹ کیلودالتون گزارش شد. نتایج حاصل از طیف مادون قرمز، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات، متیله کردن همراه با طیف سنج جرمی نشان داد که آرابینوز با اتصالات ۱ به ۵، گالاکتوز با اتصالات ۱ به ۴ و ۱ به ۳ اسکلت اصلی پلی ساکارید را تشکیل می دهند که گالاکتوزها با اتصالات ۱ به ۳ بطور تصادفی در کربن شماره ۶ خود شاخه دار می شود. شاخه های فرعی متشکل از واحدهای گلوکز با اتصالات ۱ به ۴ است و با واحدهای گالاکتوز خاتمه می یابد. بر اساس داده های حاصل از طیف سنج مادون قرمز، هر دو نوع آرایش کنفورماسیونی آلفا و بتا در ساختار پلی ساکارید وجود دارد (۵۲).

با مطالعه پلی ساکارید محلول در آب برگهای گیاه سیکلوکاریا پالیوروس، زای و همکاران در سال ۲۰۱۰ دریافتند که وزن مولکولی پلی ساکارید حاصل ۱۱۶۷ کیلودالتون است. نتایج حاصل از آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید نشان داد که از واحدهای مونوساکاریدی زایلوز، آرابینوز، گلوکز،

1 Hu

گالاکتوز، رامنوز و مانوز، به ترتیب با نسبت های مولی ۱، ۹/۶۷، ۹/۶۵، ۴/۹۶، ۳/۲۹ و ۲/۷ تشکیل شده است. داده های حاصل از آنالیز شیمیایی نیز نشان داد که پلی ساکارید حاوی ۸/۴۴٪ پروتئین است. طیف سنج های NMR و مادون قرمز پلی ساکارید نشان داد که هر دو شکل پیرانوز و فورانوز و هر دو نوع آرایش فضایی آلفا و بتا در ساختار مونوساکاریدهای سازنده این پلی ساکارید وجود دارند (۵۸).

یین و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه ساختاری پلی ساکارید محلول در آب گیاه تاکسوس یونانننسیس دریافتند که وزن مولکولی آن ۱۷/۳۷ کیلودالتون و واحدهای سازنده آن رامنوز، گالاکتوز و زایلوز با نسبت های مولی ۲، ۶/۷۴ و ۱ است. نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات، متیله کردن، طیف سنج جرمی و NMR نشان داد که اسکلت زنجیره اصلی پلی ساکارید از واحد های گالاکتوز با اتصالات ۱ به ۶ تشکیل شده است که یک در میان در کربن شماره ۳ گالاکتوز شاخه دار می شوند. گالاکتوز و رامنوز، واحدهای سازنده شاخه های فرعی هستند و شاخه ها با رامنوز و زایلوز خاتمه پیدا می کنند (۶۳).

ساختار پلی ساکارید محلول در آب قارچ کردیسپس سیننسیس توسط وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۰ بررسی شد. وزن مولکولی پلی ساکارید ۴۳/۹ کیلودالتون محاسبه شد و نتایج حاصل از اکسیداسیون پریودات، متیله کردن، طیف سنج مادون قرمز، طیف سنج جرمی و NMR نشان داد که ساختار اصلی پلی ساکارید متشکل از واحدهای گلوکز با اتصالات آلفا ۱ به ۴ و مانوز با اتصالات آلفا ۱ به ۳ است و به ازای هر ۱۲ واحد مونوساکاریدی در زنجیره اصلی، یک شاخه جانبی وجود دارد که به کربن شماره ۶ گلوکز متصل است. شاخه جانبی تنها از یک واحد مونوساکاریدی گلوکز تشکیل شده است که با اتصال آلفا ۱ به ۶ به زنجیره اصلی متصل است. تمامی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید نیز دارای اشکال پیرانوزی هستند (۵۵).

بررسی ساختار پلی ساکارید قارچ کردیسپس میلیتاریس توسط یو و همکاران در سال ۲۰۰۹ به نشان داد که پلی ساکارید از سه واحد مونوساکاریدی مانوز، گالاکتوز و گلوکز به ترتیب با نسبت های مولی ۲/۸۱، ۴/۰۲ و ۱ تشکیل شده است. نتایج حاصل از تعیین ساختار پلی ساکارید با روشهای شیمیایی (هیدرولیز اسیدی ناقص، اکسیداسیون پریودات، متیله کردن) و دستگاهی (طیف سنج مادون قرمز، جرمی و NMR) نشان داد که اسکلت اصلی پلی ساکارید از واحدهای مونومری مانوز با اتصالات آلفا ۱ به ۴ تشکیل شده است و زنجیره اصلی بصورت تصادفی از محل کربن شماره ۳ مانوز شاخه دار می شود. مونوساکاریدهای گلوکز با اتصالات آلفا ۱ به ۴ و گالاکتوز با اتصالات بتا ۱ به ۶، ساختار شاخه های فرعی را تشکیل می دهند و شاخه های فرعی با مونوساکاریدهای بتا-گالاکتوز پایان می یابند (۶۶).

وو و همکاران در سال ۲۰۰۹ با مطالعه پلی ساکاریدهای محلول در آب برگ های گیاه تاکسوس چاینننسیس به این نتیجه رسیدند که وزن مولکولی پلی ساکارید ۳۴۴۰ کیلودالتون است. نتایج تعیین ساختار پلی ساکارید با روشهای آنالیز شیمیایی و دستگاهی نشان داد که ساختار پلی ساکارید بسیار پیچیده است و این پژوهشگران بطور کامل نتوانستند ساختار پلی ساکارید را شناسایی کنند. بررسی های آنها تنها نشان دهنده وجود واحدهای مانوز با اتصالات ۱ به ۶ در ساختار زنجیره اصلی پلی ساکارید بود که از کربن شماره ۳ خود

شاخه دار می شدند. مانوز، آرابینوز، گالاکتوز، زایلوز، رامنوز، اسید گلوکورونیک و اسید گالاکتورونیک واحدهای سازنده شاخه های جانبی این پلی ساکارید هستند (۵۷).

بررسی ساختار پلی ساکارید محلول در آب ریشه های گیاه دیسکورآ اپوزیتا توسط زائو و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داد که وزن مولکولی پلی ساکارید ۴۲ کیلودالتون و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید به ترتیب گلوکز، مانوز و گالاکتوز با نسبت های مولی ۱، ۰/۳۷ و ۰/۱۱ هستند. نتایج آنالیز های شیمیایی و دستگاهی مانند متیله کردن، اکسیداسیون پریودات، طیف سنج های مادون قرمز، NMR و جرمی نشان داد که ساختار زنجیره اصلی پلی ساکارید از واحدهای گلوکوپیرانوز با اتصالات آلفا ۱ به ۳ تشکیل شده است که بطور تصادفی در کربن شماره ۶ شاخه دار می شوند. شاخه های جانبی این پلی ساکارید از واحد های مانوپیرانوز با اتصالات آلفا ۱ به ۲ تشکیل شده اند و توسط واحدهای بتاگالاکتوپیرانوز به انتها می رسند (۷۰).

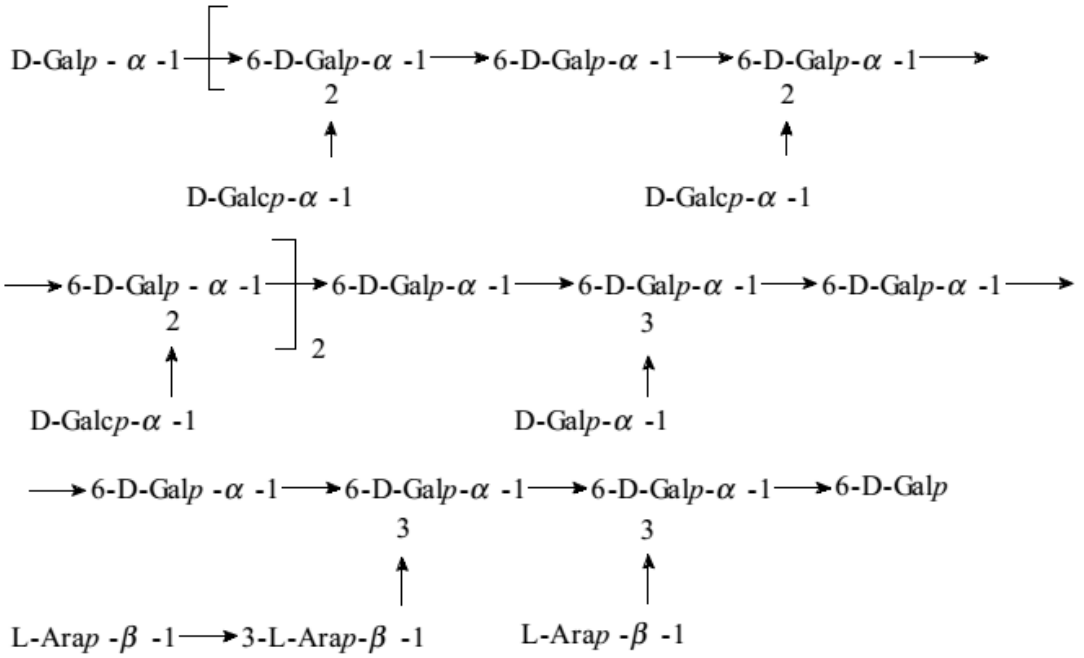
آریفخودزائف[1] در سال ۱۹۹۷ پلی ساکاریدهای موجود در بخش‌های هوایی و زمینی چوبک افغانستانی[2] را مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که بخش‌های هوایی متشکل از واحدهای گالاکتان و بخش زمینی متشکل از واحد های گلوکوگالاکتان است (۱۲).

آریفخودزائف و همکاران در سال ۱۹۹۹ پلی ساکاریدهای اندام های هوایی و زمینی چوبک نورینجیانوم[3] را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب بخش‌های هوایی از واحدهای مانوز، آرابینوز، گلوکز و گالاکتوز با نسبت های ۲: ۱: ۱۶/۸: ۱۵/۸ و بخش‌های زمینی از واحد های آرابیوز، گلوکز و گالاکتوز با نسبت های ۱: ۱۷: ۳۵ تشکیل شده است (۱۳).

کوربانوا[4] و همکاران در سال ۲۰۰۲ پلی ساکاریدهای حاصل از گیاه چوبک نورینجیانوم را مجددا مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ساختار پلی ساکارید محلول در آب آن از نوع گالاکتورونان بوده و حاوی واحدهای اسید دی گالاکتورونیک است (۳۷).

کوربانوا و همکاران در سال ۲۰۰۳ با مطالعه بر روی پلی ساکارید محلول در آب حاصل از ریشه گیاه چوبک خراسانی به این نتیجه رسیدند که ساختار پلی ساکارید آن متشکل از واحدهای گلوکز، گالاکتوز در زنجیر اصلی و آرابینوز در انشعابات زنجیر اصلی به ترتیب با نسبت‌های ۲: ۵/۳: ۱ است. شکل ۲-۱ ساختار گونه چوبک خراسانی را نشان می دهد (۳۶).

1 Arifkhodzhaev
2 *Pungens*
3 *Knorringianum*
4 Kurbanova



شکل۲-۱: ساختار گونه چوبک خراسانی را ارائه می کند (۳۶).

پلی ساکاریدهای محلول در آب موجود در ریشه گیاه چوبک افغانستانی توسط آریفخودزائف و همکاران در سال ۲۰۰۳ بررسی شد. نتایج آنها نشان داد که پلی ساکارید اصلی موجود در ریشه گیاه از نوع خنثی است و واحدهای مونوساکاریدی سازنده آن به ترتیب، گلوکز، آرابینوز و گالاکتوز با نسبت های مولی ۱/۳، ۱ و ۵/۳ است. مطالعه ساختاری پلی ساکارید توسط روشهای آنالیز شیمیایی و دستگاهی بیانگر وجود گالاکتوپیرانوز با اتصالات آلفا ۱ به ۶ در زنجیره اصلی پلی ساکارید است. واحدهای گالاکتوز در کربن‌های شماره ۲ و ۳ خود شاخه دار شده و گالاکتوپیرانوز، گلوکوپیرانوز و آرابینوپیرانوز واحدهای سازنده شاخه های جانبی هستند. واحدهای آرابینوز همچنین بصورت بتا ۱ به ۳ به هم متصل می شوند. شکل ۲-۲ نشان دهنده ساختار گونه چوبک افغانستانی می باشد (۱۴).

Glc*p* Ara*p* Gal*p* α-D-Gal*p*(1→6)-D-Gal*p*
1 2 3 OS - I

α-D-Gal*p*(1→6)-α-D-Gal*p*-(1→6)-D-Gal*p*
OS-II

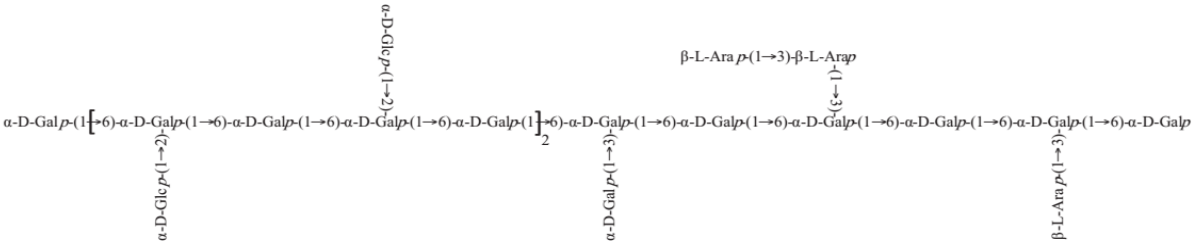
α-D-Gal*p*(1→6)-α-D-Gal*p*(1→6)-α-D-Gal*p*-(1→6)-D-Gal*p*
OS-III

شکل۲-۲: ساختار گونه چوبک افغانستانی را نشان می دهد (۱۴).

کوربانوا و همکاران در سال ۲۰۰۳ گونه چوبک خراسانی[1] را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ساختار پلی ساکارید آن متشکل از واحدهای گلوکز، گالاکتوز در زنجیر اصلی و آرابینوز در انشعابات زنجیر اصلی به ترتیب با نسبت‌های ۲: ۵/۳: ۱ است (۳۶).

کوربانوآ و همکاران (۲۰۰۳) با مطالعه بر روی پلی ساکارید محلول در آب حاصل از ریشه گیاه چوبک خراسانی نشان داد که از نظر نوع مونوساکارید های سازنده و نحوه اتصال آنها در ساختار پلی ساکارید مشابه با نتایج مذکور در مورد چوبک افغانستانی بود. تفاوت ساختاری این دو پلی ساکارید مربوط به تعداد واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده زنجیره اصلی است. بعلاوه تعداد انشعابات موجود در ساختار چوبک خراسانی نسبت به چوبک افغانستانی بیشتر است (۳۶).

جهان بین[2] و همکاران در سال ۲۰۱۱ پلی ساکاریدهای حاصل از ریشه‌های گونه چوبک تماشایی را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که متشکل از واحدهای گلوکز، گالاکتوز و آرابینوز با نسبت‌های ۱/۴: ۵/۲: ۱ است. ساختار گونه چوبک تماشایی در شکل ۲-۳ نشان داده شده است (۳۴).



شکل۲-۳: ساختار گونه چوبک تماشایی را ارائه می کند (۳۴).

.

1 Borszczowii
2 Jahanbin

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱- مواد اولیه و محلول های شیمیایی

۳-۱-۱- جمع آوری ریشه گیاه چوبک نکائی

ریشه های گیاه در خرداد ماه ۱۳۹۳ از منطقه قوچان واقع در استان خراسان جمع آوری شد و شناسایی گونه آن توسط دکتر ولی الله مظفریان، گیاهشناس معروف، صورت گرفت. ریشه های گیاه پس از انتقال به آزمایشگاه، در مجاورت هوا، خشک و سپس در دمای اتاق نگهداری شدند. قبل از خرد کردن ریشه های گیاه، برای جدا کردن سایر مواد ناخالصی چسبیده به بخش بیرونی ریشه ها، پوسته خارجی آنها توسط چاقو تمیز شدند. سپس ریشه ها توسط آب شسته و در مجاورت با هوا خشک شدند. در نهایت ریشه ها به قطعات ریز به ابعاد ۰/۵ سانتی متری خرد شدند.

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

دکستران با وزن های مولکولی متفاوت (۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون)، دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ از شرکت فارماسیا (اپسالا[1]، سوئد) تهیه شدند. مونوساکاریدهای استاندارد خالص (د-مانوز، ال-رامنوز، د-گلوکز، د-گالاکتوز، ال-آرابینوز، د-زایلوز و ال-گالاکتورونیک اسید)، دی متیل سولفوکساید[2] و DSS از شرکتهای سیگما[3] (آمریکا) و مرک[4] (آلمان) خریداری شدند. اسید تری فلورو استیک از شرکت فلوکا[5] تهیه شد. تمامی محلول های آبی لازم برای آزمایش با استفاده از آب مقطر (ساخت شرکت جی اف ال[6]، آلمان) تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی مورد آزمایش مانند انواع اسیدها، بازها و .... دارای درجه خلوص آزمایشگاهی بودند.

۳-۲- دستگاه های مورد استفاده

سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ rpm و قابل استفاده در مقیاس حجمی بالا (۱ لیتری) ساخت شرکت اپندورف[7]، آلمان. ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم ساخت شرکت ای اند دی[8] ژاپن. تبخیر کننده دورانی همراه با پمپ های خلا مخصوص، ساخت کشور هیدلف[9] آلمان. دستگاه پلاریمتر پرکین المر[10] ۳۴۳ ساخت کشور آمریکا. دستگاه اسپکتروفتومتر واریان کری ۱۰۰- بیو[11] ساخت کشور آمریکا. طیف سنج مادون قرمز،

1 Uppsala
2 DMSO
3 Sigma
4 Merck
5 Fluka
6 GFL
7 Eppendrof
8 A & D
9 Heidolph
10 Perkin-Elmer
11 Varian Cary 100-Bio

نیکولت[1] ۵۷۰۰ ساخت کشور آمریکا. کروماتوگرافی گازی واریان ۳۴۰۰ ساخت کشور آمریکا. کروماتوگرافی غربال مولکولی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (شیمادزو[2]) همراه با ستون ژل-تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال[3] ساخت توسو[4] ژاپن. طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای مدل بروکر آ وی-۵۰۰[5] ساخت کشور آلمان. دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی مدل اچ پی[6] ۵۸۹۰ ساخت کشور آمریکا.

از سایر وسایل و دستگاه های مورد استفاده در این پژوهش می توان به انواع ستون های کروماتوگرافی، کیسه دیالیز با cut off ۳/۵ کیلودالتون، قیف های بوخنر، کاغذ های صافی، دسیکاتور، فراصوت، بن ماری (حمام آب گرم) و دکانتورها اشاره کرد.

۳-۳- روش کار

۳-۳-۱- استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه های گیاه چوبک نکائی

۳-۳-۱-۱- حذف مواد چربی دوست

ریشه های خرد شده گیاه با استفاده از اتانل ۹۵٪ (به نسبت ۱ قسمت ریشه به ۱۰ قسمت اتانل) در دمای جوش و به مدت ۱۰ ساعت چربی زدایی شدند. برای دست یافتن به نتایج بهتر، هر سه ساعت یکبار اتانل مصرفی با اتانل تازه جایگزین شد. در این مرحله رنگها، مواد چربی دوست، ساپونین ها و همچنین مونوساکاریدها حذف شدند و اتانل مصرفی که حاوی ترکیبات غیر ضروری و مزاحم برای جداسازی است دور ریخته شدند. در نهایت ریشه های گیاه پس از صاف شدن، در مجاورت با هوا خشک شدند.

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

جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از هر ۱۰۰ گرم نمونه گیاهی خشک، پس از شستشو با اتانل، توسط یک لیتر آب گرم (۵۰°C) به مدت ۱۰ ساعت انجام شد. این مرحله ۳ بار تکرار شد و در نهایت عصاره های آبی حاصل از تمام مراحل با هم ترکیب شدند.

1 Nicolt
2 Shimadzu
3 TSK-GEL G3000 PWXL
4 Tosoh
5 Bruker A V-500
6 Hp

۳-۳-۱-۳- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب

برای جداسازی پلی ساکاریدها از عصاره آبی ابتدا باید سایر ناخالصی ها مانند پروتئین ها از عصاره آبی جدا شوند. حذف پروتئین ها از عصاره آبی توسط معرف سواگ (۱-بوتانل و کلروفرم) انجام شد (۵۰). مقدار کلروفرم مصرفی۲۰٪ حجم عصاره آبی و مقدار ۱-بوتانل، ۲۰٪ حجم کلروفرم مصرفی بود. پس از اختلاط محلول به مدت ۱ ساعت، عصاره آبی-الکلی با دور rpm ۴۰۰۰ و مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت عصاره آبی فاقد پروتئین از بخش فوقانی محلول جدا شد. برای اطمینان از حذف کامل پروتئین ها این مرحله سه بار تکرار شد.

ترسیب پلی ساکاریدها از عصاره آبی فاقد پروتئین با افزودن اتانل ۹۶ درجه (به میزان سه برابر حجم عصاره) انجام شد. رسوبات حاصل پس از جداسازی با سانتریفیوژ توسط اتانل ۹۶ درجه شستشو داده شدند. شستشوی نهایی بر روی کاغذ صافی توسط اتانل مطلق و استن انجام شد. در نهایت رسوبات حاصل (پلی ساکارید های محلول در آب) پس از حل شدن در آب مقطر، در دمای اتاق و بر روی کاغذ صافی خشک شدند.

۳-۳-۲- خالص سازی پلی ساکاریدها

روش های خالص سازی مورد استفاده برای کاربرد پلی ساکاریدها در صنایع مختلف، با روش های خالص سازی مورد استفاده جهت شناسایی و تعیین ساختار آنها متفاوت است. بعبارت دیگر، روش های خالص سازی پیشرفته با انواع ستون های کروماتوگرافی اغلب بسیار پرهزینه، زمان بر، سخت و طاقت فرسا است و به تولید نمونه های کاملا خالص ولی با راندمان پایین می انجامند که مناسب برای تعیین ساختار هستند (۵۷).

۳-۳-۲-۱- خالص سازی پلی ساکاریدهای محلول در آب

برای خالص سازی پلی ساکاریدهای محلول در آب، ابتدا پلی ساکاریدهای خام حاصل از مرحله استخراج در حجم کمی از آب مقطر حل شد و پس از عبور از صافی های ۰/۴۵ میکرومتر وارد ستون کروماتوگرافی حاوی دی اتیل آمینو اتیل سلولز (۲/۶ سانتیمتر × ۳۰ سانتیمتر) شد. قبل از استفاده کردن از دی اتیل آمینو اتیل سلولز، انجام یکسری مراحل برای آماده سازی آن ضروری است. در صورتیکه این مراحل به درستی انجام نشود ممکن است مقداری از مواد سلولزی وارد فراکشن های حاصل از ستون شود و در شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها مزاحمت ایجاد کند (۵۷).

برای این منظور ابتدا دی اتیل آمینو اتیل سلولز خشک به ترتیب توسط اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال و سود ۰/۵ نرمال در داخل یک بشر بصورت دوغاب در آمد و سپس در داخل یک دسیکاتور تحت خلا قرار گرفت تا ته نشین شود. برای خروج حباب های هوای به دام افتاده در بین مواد سلولزی، که ممکن است سبب شکسته و تکه تکه شدن این مواد در داخل ستون شود، از دسیکاتور تحت خلا استفاده شد. این فرایند ۳ بار تکرار شد و هر بار محلول کدر رویی جدا و دی اتیل آمینو اتیل سلولز، در یک قیف بوخنر توسط آب مقطر شسته شد (۵۷).

پس از پایان این مراحل، دی اتیل آمینو اتیل سلولز در داخل محلول ۰/۱ نرمال سود بصورت معلق درآمد و بصورت یک لایه نازک وارد ستون کروماتوگرافی (۲/۶ سانتیمتر × ۳۰ سانتیمتر) شد. شستشوی ستون کروماتوگرافی توسط آب مقطر چندین بار تکرار و پس از متراکم شدن مواد سلولزی در داخل ستون، آماده جهت انجام مراحل خالص سازی پلی ساکارید مورد نظر شد (۵۷).

پس از اینکه پلی ساکاریدها وارد ستون شدند، ستون توسط آب مقطر شسته شد و نظارت بر انجام فرایند توسط روش فنل-اسید سولفوریک، که در قسمت تعیین قند کل شرح داده شده است انجام گرفت.

در ادامه جزء های حاصل وارد ستون کروماتوگرافی ژل تراوای سفادکس جی-۱۰۰ (۱/۶ سانتیمتر × ۷۰ سانتیمتر) شدند. شستشوی ستون با استفاده از آب مقطر با سرعت جریان حجمی ۹ میلی لیتر بر ساعت انجام شد و در نهایت جزء پلی ساکارید اصلی (غالب) جمع آوری و خشک شد. پلی ساکارید محلول در آب حاصل، سفید و کاملا خالص و برای مطالعات شناسایی و تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب چوبک نکائی

فراکشن پلی ساکاریدی غالب حاصل از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰، کاملا خالص و سفید رنگ بود و با نام پلی ساکارید محلول در آب جهت شناسایی و تعیین ساختار استفاده شد. در زیر روش های مورد استفاده در این پژوهش برای شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکارید غالب موجود در ریشه گیاه چوبک نکائی شرح داده شده است.

۳-۳-۳-۱- تعیین همگنی[1] و وزن مولکولی پلی ساکارید

همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب توسط روش های کروماتوگرافی روی ستون سفادکس جی-۱۰۰ و کروماتوگرافی ژل تراوا با کارآیی بالا، توسط سیستم کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (شیمادوز)

1 Homogeneity

همراه با ستون ژل-تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال ساخت توسو ژاپن (۷/۸ × ۳۰۰ میلی متر) انجام شد. شستشوی ستون توسط محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم با سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد و 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) حاصل شد و دمای ستون در طول آزمایش بر روی ۴۰°C ثابت ماند. وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب با مقایسه منحنی کالیبراسیون پلی ساکارید با منحنی های کالیبراسیون استانداردهای دکستران محاسبه شد (۵۳).

۳-۳-۳-۲- طیف سنج مادون قرمز

طیف مادون قرمز پلی ساکارید محلول در آب توسط طیف سنج مادون قرمز مدل نیکولت ۵۷۰۰ (مدیسون، آمریکا) حاصل شد. برای انجام آنالیز پلی ساکارید کاملا خالص (۱-۲ میلی گرم) با پودر برومور پتاسیم (درجه خلوص اسپکتروسکوپی) مخلوط و پس از فشرده شدن به شکل قرص ۱ میلی متری در آمد و در محفظه ویژه دستگاه قرار داده شد. در نهایت نمودار تغییرات درصد نور عبور داده شده بر حسب فرکانس در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} رسم شد (۴۸).

۳-۳-۳-۳- تعیین درجه چرخش نوری

برای تعیین درجه چرخش نوری از دستگاه پلاریمتر پرکین المر ۳۴۳ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. برای انجام آزمایش ۱۰۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در حمام آب جوش به مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد. سپس ۵ میلی گرم پلی ساکارید هیدرولیز شده در یک بالن ژوژه ۵ میلی لیتری به حجم رسانده شد و وارد لوله ۲ دسی متری دستگاه شد. اندازه گیری در دمای ۲۰°C و طول موج ۵۸۹ نانومتر انجام شد و در نهایت عدد خوانده شده از دستگاه در رابطه زیر قرار داده شد و درجه چرخش نوری محاسبه گردید (۱۸).

$$\alpha = \frac{\alpha'}{L \times C} \qquad (۱-۳)$$

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

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

همانطور که قبلا عنوان شد پروتئین ها در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش دارای جذب قوی هستند بنابراین عدم جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش، نشان دهنده عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلوئیک در ساختار پلی ساکارید و عملکرد خوب در مراحل خالص سازی قبلی است. برای انجام آزمایش محلولی از پلی ساکارید (غلظت مهم نیست) تهیه و وارد سلولی از جنس کوارتز شد. سپس جذب محلول در ناحیه ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر واریان کری ۱۰۰- بیو (ساخت کشور آمریکا) ثبت شد (۴۴).

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

برای تعیین میزان قند کل از روش فنل-اسید سولفوریک استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا دو میلی گرم پلی ساکارید در داخل لوله کلریمتری توزین و به آن یک میلی لیتر فنل ۵٪ به همراه ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۶ درجه اضافه شد. لوله به مدت ۱۰ دقیقه به حال خود رها شد و سپس برای مدت زمان ۲۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۲۷°C قرار گرفت. پس از اینکه محلول داخل لوله صاف شد، میزان جذب رنگ حاصل (زرد یا نارنجی رنگ) توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل واریان کری ۱۰۰- بیو)[1] در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. آب مقطر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. برای تعیین میزان قند کل نیاز به منحنی استاندارد بود که با استفاده از غلظت های مختلف د-گلوکز حاصل شد (۲۴).

برای تعیین نوع و مقدار واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید از کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳۴۰۰ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. ستون مورد استفاده از نوع مویینه[2] مدل دی ام-۲۳۳۰[3] (۳۰ متر × ۰/۳۲ میلی متر × ۰/۲ میکرومتر) و آشکار ساز مورد استفاده از نوع یونش شعله ای[4] بود. دمای ستون در ۱۲۰°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای ۲۵۰°C (با نرخ ۸°C بر دقیقه) افزایش و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۵۰°C ثابت ماند. ازت به عنوان گاز حامل با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت و دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰°C و ۳۰۰°C بود. آماده سازی نمونه برای تزریق به دستگاه به شرح زیر انجام گرفت.

ابتدا ۱۵ میلی گرم پلی ساکارید در داخل لوله آزمایش توزین و به آن ۲ میلی لیتر محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک اضافه شد. سپس درب لوله ها بسته شد و در دمای ۱۲۰°C به مدت ۲ ساعت حرارت

1 Varian Cary 100-Bio
2 Capillary column
3 DM-2330
4 Flame-ionization

داده شدند. اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب ۴۰°C حذف شد و نمونه هیدرولیز شده با ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم خنثی شد. اسیدی کردن نمونه ها با استفاده از اسید استیک انجام شد و اسید بوریک اضافی با استفاده از متانول حذف گردید. آلدیتول های حاصل توسط اختلاط با پیریدین-انیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام آب ۹۰°C به مدت ۱ ساعت استیله و به استات های آلدیتول مربوطه تبدیل شدند. استات های آلدیتول مونوساکاریدهای استاندارد (د-گلوکز، د-گالاکتوز، ال-رامنوز، د-مانوز، ال-آرابینوز، د-زایلوز و ال-گالاکتورونیک اسید) همراه با ۲ میلی گرم میو-اینوزیتول (به عنوان استاندارد داخلی) به دستگاه کروماتوگرافی گازی (در بالا شرح داده شد) تزریق شدند (۱۸، ۲۰).

۳-۳-۳-۶- هیدرولیز اسیدی ناقص

هیدرولیز اسیدی ناقص پلی ساکارید محلول در آب توسط روش تانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد. برای انجام آزمایش ابتدا ۸۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۳ میلی لیتر محلول ۰/۰۵ مولار اسید تری فلورواستیک در دمای ۸۰°C به مدت ۱۶ ساعت هیدرولیز شد. پلی ساکارید هیدرولیز شده به منظور حذف رسوبات سانتریفیوژ شد و رسوبات جدا شده با نام پلی ساکارید ۱ نامگذاری شدند. سپس سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد و فراکشن جدا شده جمع آوری و با نام پلی ساکارید ۴ نامگذاری شد. سیال باقی مانده در کیسه دیالیزی توسط اتانل ترسیب شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب با نام های پلی ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند. تمامی فراکشن ها پس از خشک شدن بوسیله کروماتوگرافی گازی، به همان شکل که در بالا شرح داده شد، آنالیز شدند (۱۵).

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

ابتدا ۲۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۴ مولار پریودات سدیم[1] اکسیده شد و پس از نگهداری در تاریکی، هر ۴ ساعت یکبار میزان جذب آن در ۲۳۳ نانومتر ثبت شد. پایان اکسیداسیون با ثابت شدن میزان جذب پس از ۹۶ ساعت تعیین شد و پریودات سدیم مازاد با افزودن اتیلن گلیکول حذف شد. مصرف پریودات و تولید اسید فرمیک به ترتیب توسط روش های اسپکتروفوتومتری و تیتراسیون با محلول ۰/۰۵۳ مولار سود اندازه گیری شدند. محلول حاصل از پریودات به مدت ۴۸ ساعت دیالیز و سپس توسط ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم (در دمای ۲۵°C و به مدت ۱۲ ساعت) خنثی شد. در نهایت هیدرولیز کامل با محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک، به همان صورت که در بخش ۳-۳-۳-۵ شرح داده شد، انجام شد و محصولات حاصل پس از استیله شدن توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند (۱۵، ۲۰، ۷۰).

1 $NaIO_4$

۳-۳-۳-۸- متیله کردن

برای انجام آزمایش ابتدا ۵ گرم پلی ساکارید کاملا خشک، وارد بالن ۲۵ میلی لیتری ته گرد شد و توسط سرنگ شیشه ای، ۱ میلی لیتر DMSO به آن اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فراصوت دهی شد و مجددا توسط سرنگ شیشه ای، ۰/۴ میلی لیتر محلول متیل سولفینیل متیل سدیم[1] به آن اضافه شد. ژل حاصل توسط امواج فراصوت در دمای ۲۵°C به مدت ۲۰ دقیقه فراوری و تبدیل به مایع شد. سپس ۰/۳ میلی لیتر یدید متیل خشک به آن اضافه شد و مجددا در دمای ۲۵°C به مدت ۱۵ دقیقه توسط امواج فراصوت فرایند شد. مخلوط حاصل به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار کمی آب، برای خنثی کردن متیل سولفینیل متیل سدیم اضافی، به آن اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به لوله های سانتریفیوژی ۱۲ میلی لیتری منتقل شدند و پلی ساکارید متیله شده موجود در سوسپانسیون توسط ۴ میلی لیتر کلروفرم استخراج شد و توسط طیف سنج مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت. عدم پیک جذبی در نواحی مربوط به گروه هیدروکسیل (حدود ۳۴۲۰ cm^{-1}) نشانه کامل شدن فرایند متیله کردن است. محصولات متیله شده توسط اسید فرمیک و محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک هیدرولیز شدند و پس از حذف اسید اضافی توسط بروهیدرید سدیم خنثی شدند. آلدیتول های حاصل توسط مخلوط پیریدین-انیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام آب ۹۰°C به مدت ۱ ساعت استیله شدند و به استات های آلدیتول مربوطه تبدیل شدند. در نهایت استات های آلدیتول پاره ای متیله شده توسط کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی آنالیز شدند. کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی مورد استفاده مجهز به ستون مویینه کوارتزی HPS (۲۵ متر × ۰/۲۲ میلی متر × ۰/۲ میکرومتر) بود. دمای ستون در ۱۲۰°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای ۲۶۰°C (با نرخ ۱۵°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۲۶۰°C ثابت ماند. سایر مشخصات مشابه با کروماتوگرافی گازی مورد استفاده در بخش ۳-۳-۳-۵ بود (۴۴،۲۰).

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

طیف های NMR کربن-۱۳ و پروتون پلی ساکارید توسط طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز برای NMR پروتون و ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز برای NMR کربن-۱۳ در دمای ۲۷°C ثبت شد. استاندارد مورد استفاده DSS و زمان بازداری ۲ ثانیه بود. مقداری از پلی ساکارید در حلال بی اثر D_2O

1 Methylsulfinyl methyl sodium

(۹۹/۹٪)بصورت محلول در آمد و سپس در بین دو قطب مغناطیس دستگاه قرار گرفت. جابجایی شیمیایی پیک ها بر حسب ppm نمایش داده شد (۲۵).

فصل چهارم
بحث و نتایج

۴-۱- استخراج و خالص سازی پلی ساکارید

۴-۱-۱- استخراج و خالص سازی

راندمان استخراج پلی ساکارید ناخالص با آب گرم ۳/۴٪ بود که پس از خالص سازی با ستون های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ حدود ۲/۳۴٪ پلی ساکارید خالص حاصل شد. شکل ۴-۱ پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی را نشان می دهد. راندمان تولید پلی ساکارید از ریشه های گیاه چوبک نکائی کمتر از گونه های تماشایی (۱۱٪)، افغانستانی (۱۰٪) و نورینجیانوم (۵/۷٪) بود. می توان این گونه استنباط کرد که تفاوت در راندمان ناشی از تفاوت در گونه، محل کشت، آب و هوا و سایر شرایط اقلیمی است که گیاه در آن رشد کرده است.

شکل ۴-۱- پلی ساکاریدهای کاملا خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی

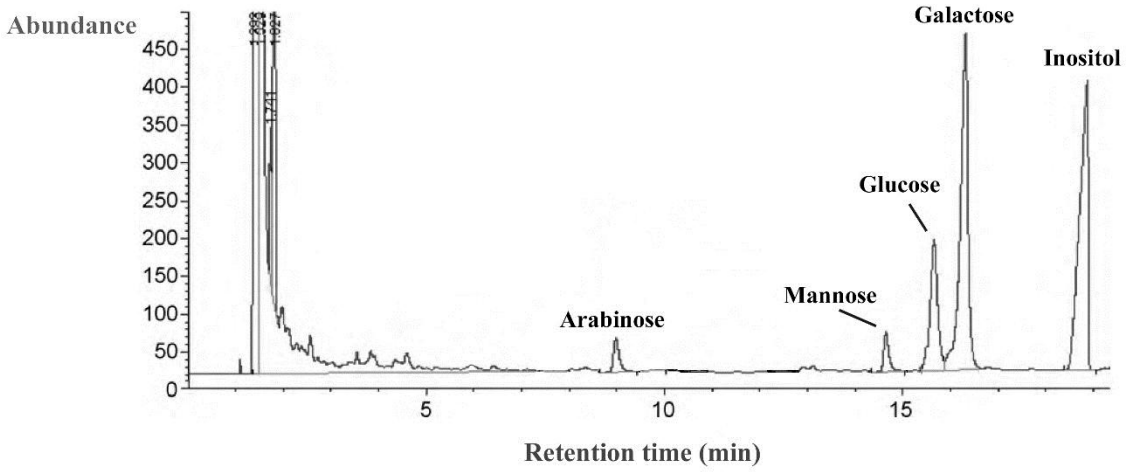
پلی ساکارید خالص جذبی در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش نداشت که بیانگر عدم حضور پروتئین و اسید نوکلئویک در ساختار پلی ساکارید است. لذا می توان استنباط کرد که مراحل خالص سازی بخوبی صورت گرفته و پروتئین ها در مرحله سواگ کاملا حذف شده اند.

۴-۲- شناسایی ساختار پلی ساکارید

۴-۲-۱- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید

مقدار قند کل پلی ساکارید خالص پس از اندازه گیری با روش فنل-اسید سولفوریک ۹۸/۲٪ تعیین شد. ناخالصی حاصل به دلیل وجود آب تک لایه در نمونه می باشد. مقدار بالای قند کل پلی ساکارید خالص

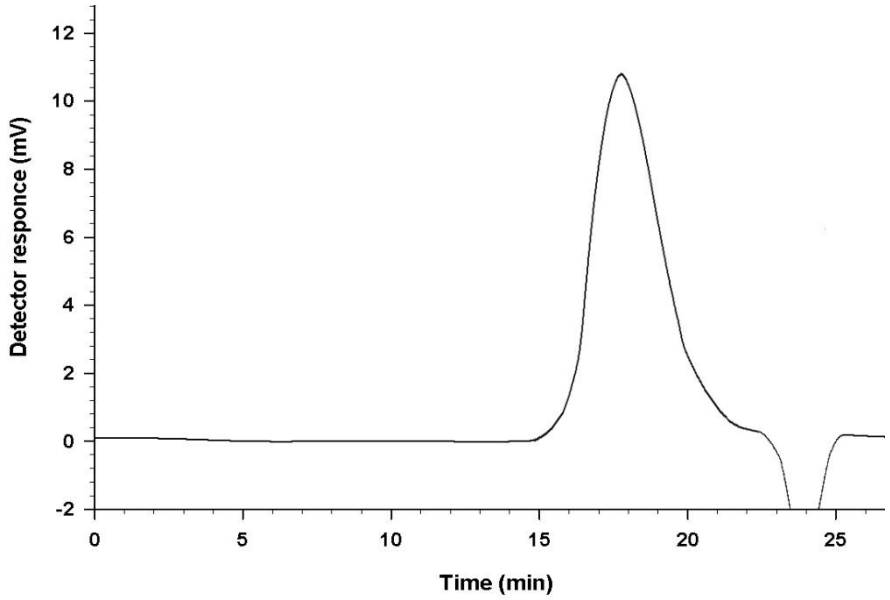
(۹۸/۲٪) دلالت بر درجه خلوص بالای پلی ساکارید استخراجی دارد و نشان می دهد که مراحل خالص سازی به خوبی صورت گرفته و مواد ناخالص کاملا حذف شده اند. نتایج حاصل از تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی نشان داد که پلی ساکارید حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی از واحد های مونومری گالاکتوز، گلوکز، آرابینوز و مانوز به ترتیب با نسبت های مولی ۶/۱، ۲/۹، ۰/۹ و ۱ تشکیل شده است. طیف کروماتوگرام گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص در شکل ۴-۲ نشان داده شده است. نسبت های مولی حاصل نشان می دهد که گالاکتوز و پس از آن گلوکز واحدهای مونومری اصلی سازنده پلی ساکارید خالص هستند. نتایج حاصل از نوع و نسبت های مولی واحد مونومری سازنده پلی ساکارید چوبک نکائی در مقایسه با سه گونه نورینجیانوم، تماشایی و خراسانی نشان می دهد که تنها گونه حاوی واحد مونومری مانوز، گونه چوبک نکائی است و در سه گونه دیگر واحد های مونومری گالاکتوز، گلوکز و آرابینوز با نسبت های مختلف با گونه چوبک نکائی وجود دارند. چوبک نکائی دارای نسبت بیشتری از گالاکتوز (۶/۱) و گلوکز (۲/۹) نسبت به دو گونه تماشایی با نسبت گالاکتوز (۵/۲) و گلوکز (۱/۴) و خراسانی با نسبت گالاکتوز (۵/۳) و گلوکز (۲) است ولی از گونه نورینجیانوم با نسبت گالاکتوز (۳۵) و گلوکز (۱۷) کمتر است. نسبت آرابینوز تقریبا مشابه سه گونه دیگر است (۳۷،۳۶،۳۴).



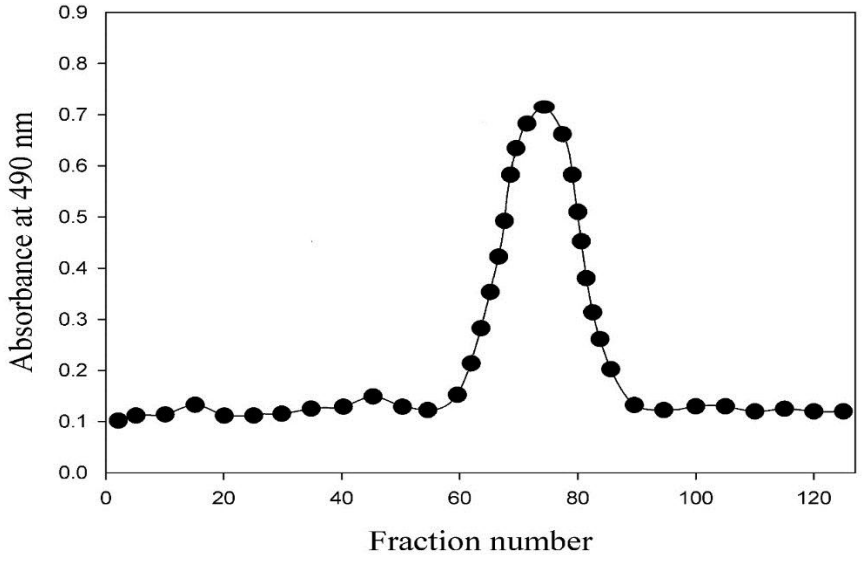
شکل ۴-۲ - طیف کروماتوگرام گازی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص (ستون مویینه، آشکار ساز یونش شعله ای، دمای ستون $^{\circ}C$ ۱۲۰ و ۱۵ میلی گرم پلی ساکارید بعلاوه ۲ میلی لیتر اسید تری فلورواستیک، گاز ازت با سرعت جریان ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده بود)

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

وزن مولکولی پلی ساکارید خالص با استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی با ستون سفادکس جی-۱۰۰ و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا محاسبه شد و از استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی متفاوت استفاده گردید. منحنی حاصل از هر دو روش پیک کاملا متقارن و منحصر بفردی را نشان داد که بیانگر همگنی پلی ساکارید خالص است. میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص پس از مقایسه منحنی های استاندارد دکستران با منحنی پلی ساکارید خالص ۳۵/۲ کیلو دالتون محاسبه شد که بیشتر از وزن مولکولی گونه تماشایی (۲۶ کیلو دالتون) و کمتر از وزن مولکولی گونه های افغانستانی (۳۷ کیلو دالتون) و نورینجیانوم (۳۸ کیلو دالتون) است. منحنی های حاصل از کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارآیی بالا و ستون سفادکس جی-۱۰۰ مربوط به پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی به ترتیب در شکل ۴-۳ و ۴-۴ آمده است (۳۷،۳۴،۱۴).



شکل ۴-۳: کروماتوگرام پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی با استفاده از HPGPC روی ستون TSK-GEL G 3000 PWXL



شکل ۴-۴: منحنی فراکشن های پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی با استفاده از ستون سفادکس جی-۱۰۰

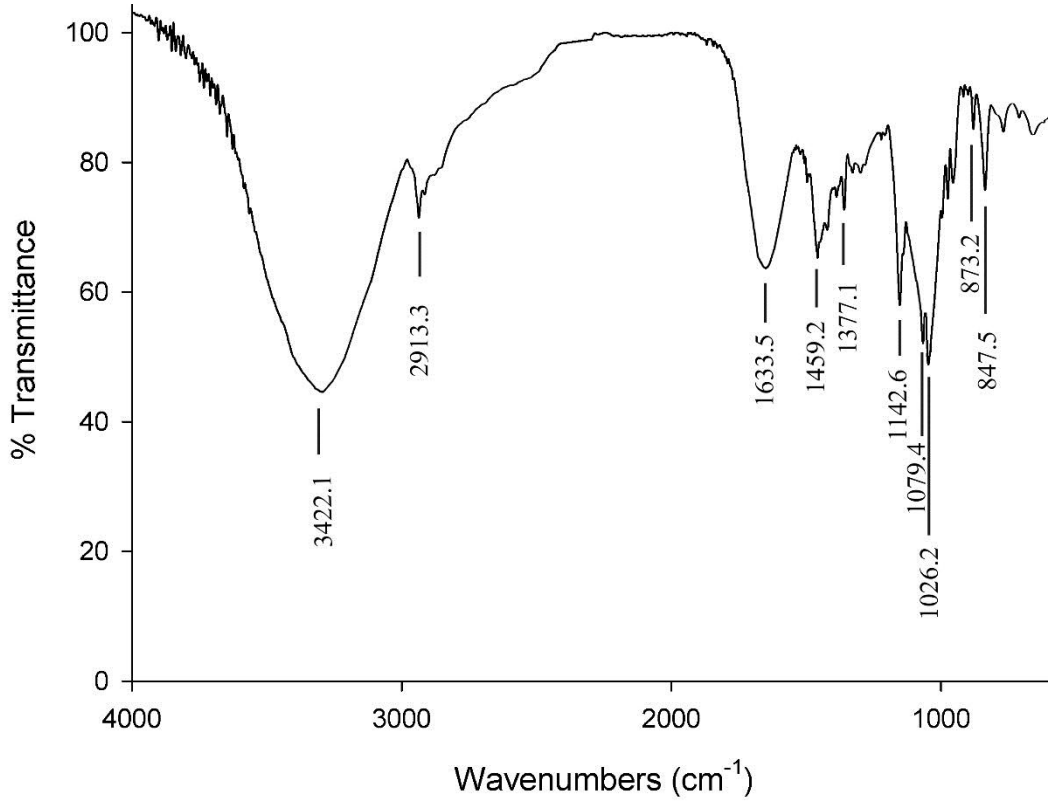
۴-۲-۳- تعیین درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی در دمای ۲۰°C با دستگاه پلاریمتر $+۱۷۸/۵^{\circ}$ محاسبه شد که بیانگر وجود تعداد زیادی اتصالات نوع α نسبت به نوع β در ساختار پلی ساکارید خالص است (۳۴). لذا این طور استنباط می شود که واحدهای مونومری گالاکتوز که بخش اعظم ساختار پلی ساکارید خالص را شامل می شوند اکثرا از طریق اتصالات نوع α به هم وصل شده اند.

۴-۲-۴- طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص

طیف مادون قرمز در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی بمنظور بررسی گروه های شیمیایی موجود در ساختار آن مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی شکل ۴-۵ مشاهده می شود که طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص پیک کشیده بزرگی در محدوده $۳۴۲۲/۱\ cm^{-1}$ دارد که بیانگر گروه هیدروکسیل (OH) است. وجود پیک ضعیف در محدوده $۲۹۱۳/۳\ cm^{-1}$ بیانگر اتصالات C-H مربوط به کربن شماره ۶ قند است و پیک پهن در ناحیه $۱۶۳۳/۵\ cm^{-1}$ اتصال با آب را نشان می دهد. طیف در ناحیه $۱۴۵۹/۲\ cm^{-1}$ و ۱۳۷۷/۱ بیانگر ارتعاشات C-H در ساختار حلقه است. طیف در ناحیه $۱۱۴۲/۶\ cm^{-1}$ بیانگر اتصالات اتری C-O یا (C-O-C) است و وجود سیگنال در ناحیه $۱۰۷۹/۴\ cm^{-1}$ و ۱۰۲۶/۲ بیانگر اتصالات الکلی C-O یا (C-O-H) است. طیف در ناحیه $۸۷۳/۲\ cm^{-1}$ و ۸۴۷/۵ به ترتیب بیانگر وجود هر دو شکل کونفورماسیونی بتا (β) و آلفا (α) در ساختار پلی ساکارید خالص است (۳۴). لذا

می توان نتیجه گیری کرد که پلی ساکارید خالص از واحد های مونومری قندی با هر دو نوع اتصال α و β تشکیل شده است.



شکل ۴-۵: طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی.

۴-۲-۵- هیدرولیز ناقص اسیدی

چهار فراکشن پلی ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)، پلی ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)، پلی ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز) و پلی ساکارید ۴ (فراکشن بیرون از کیسه دیالیز) پس از انجام هیدرولیز اسیدی ناقص از پلی ساکارید خالص بازیافت و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی (جدول ۴-۱) نشان داد که گالاکتوز در پلی ساکارید ۱ و ۲ سازنده اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص در چوبک نکائی است و گلوکز، آرابینوز و مانوز موجود در پلی ساکارید ۳ و ۴ اجزای سازنده شاخه های جانبی پلی ساکارید خالص هستند.

جدول ۴-۱: نتایج GC مربوط به هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های چوبک نکائی

فراکشن ها	واحدهای مونومری			
	گلوکز	گالاکتوز	آرابینوز	مانوز
پلی ساکارید ۱	−	+	−	−
پلی ساکارید ۲	−	+	−	−
پلی ساکارید ۳	+	−	+	+
پلی ساکارید ۴	+	−	+	+

۴-۲-۶- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت

نتایج مربوط به اکسیداسیون پریودات نشان داد که ۱/۱۹ مول پریودات مصرف شد و در حدود ۰/۵۴ مول اسید فرمیک تولید گردید. مقدار مصرف پریودات در حدود ۲ برابر اسید فرمیک تولید شده بود که بیانگر وجود مقادیر زیادی اتصالات ۶←۱ در ساختار پلی ساکارید خالص است. مقدار اسید فرمیک تولید شده (۰/۵۴ مول) بیانگر این است که اتصالات دیگری مانند ۲←۱، ۳←۱، ۴←۱، ۳،۶←۱ و ۲،۶←۱ در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارند که قادر به تولید اسید فرمیک نیستند.

آنالیز کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از پریودات کاملا هیدرولیز شده نشان دهنده حضور گالاکتوز، گلوکز و آرابینوز و عدم حضور مانوز بود (جدول ۴-۲). حضور گالاکتوز، گلوکز و آرابینوز بیانگر این واقعیت است که برخی از واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده دارای اتصالاتی هستند که نمی توانند اکسید شوند مانند (۳←۱)، (۲،۳←۱)، (۲،۴←۱)، (۳،۴←۱)، (۳،۶←۱) و (۲،۳،۴←۱). از طرف دیگر عدم حضور مانوز بیانگر این است که تمامی واحدهای مانوز دارای اتصالاتی هستند که می توانند توسط پریودات اکسید شوند مانند ←۱، (۶←۱)، (۲←۱)، (۲،۶←۱)، (۴←۱) و (۴،۶←۱).

جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی مربوط به هیدرولیز اسیدی ناقص، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک نکائی.

فراکشن ها	نسبت های مولی				
	گلیسرول	گلوکز	گالاکتوز	آرابینوز	مانوز
هیدرولیز اسیدی ناقص					
پلی ساکارید ۱	-------	-------	۱/۰۰	-------	-------
پلی ساکارید ۲	-------	-------	۱/۰۰	-------	-------
پلی ساکارید ۳	-------	۳/۱۴	مقدار ناچیز	۱/۰۰	۰/۹۷
پلی ساکارید ۴	-------	۳/۰۸	مقدار ناچیز	۱/۰۰	۰/۹۹
محصولات اکسیداسیون پریودات					
هیدرولیز با اسید	۱۲/۸۲	۲/۹۸	۳/۰۴	۱/۰۰	-------
تجزیه اسمیت					
بیرون از کیسه دیالیزی	۱۳/۳۱	۳/۱۱	۲/۹۶	۱/۰۰	-------
بر روی کیسه دیالیزی	-------	-------	-------	-------	-------
رسوب بر روی کیسه دیالیزی	-------	-------	-------	-------	-------

عدم مشاهده رسوب در کیسه دیالیزی نشان دهنده این است که اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص توسط پریودات کاملا اکسید شده است. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که ساختار اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص بدست آمده از ریشه گیاه چوبک نکائی دارای اتصالاتی است که می تواند توسط پریودات اکسید شوند مانند ۱←، (۶←۱)، (۲←۱)، (۲،۶←۱)، (۴←۱)، (۴،۶←۱).

۴-۲-۷- متیله کردن

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی وجود ۸ پیک متفاوت را نشان داد. این پیک ها پس از شناسایی با طیف سنج جرمی عبارتند از:

۲، ۳، ۴، ۶- تترا متیل مانوز، ۲، ۳، ۴، ۶- تترا متیل گلوکز، ۲، ۴، ۶- تری متیل گلوکز، ۲، ۳، ۴- تری متیل گالاکتوز، ۳، ۴- دی متیل گالاکتوز، ۲، ۴- دی متیل گالاکتوز، ۲، ۳، ۴- تری متیل آرابینوز و ۲، ۴- دی متیل آرابینوز که به ترتیب با نسبت های مولی حدود ۲، ۳، ۳، ۶، ۲، ۴، ۱ و ۱ در ساختار پلی ساکارید خالص وجود داشتند (جدول۴-۳) نتایج حاصل از متیله کردن با نتایج قبلی مربوط به هیدرولیز ناقص اسیدی و اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت سازگاری داشت و بیانگر این حقیقت است که واحدهای گالاکتوز سازنده اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص است که از طریق اتصالات ۶→۱ به یکدیگر متصل هستند که در برخی از نقاط زنجیره اصلی (کربن های ۲ و ۳) منشعب می شوند. انشعابات توسط واحد های مونومری گلوکز، آرابینوز و مانوز به انتها می رسد. عدم وجود گروه متیل بر روی کربن شماره ۵ تمام واحد های مونومری نشاندهنده وجود اشکال پیرانوزی در واحد های مونومری سازنده پلی ساکارید خالص است. این نتایج با نتایج تعیین واحدهای قندی پلی ساکارید خالص از لحاظ کمی و کیفی همخوانی داشت و از طرف دیگر محل انشعابات و نوع آنها در تطابق با نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی بود.

جدول۴-۳: نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص چوبک نکائی متیله شده.

قند متیله شده	نسبت مولی	فراگمنت های جرمی(m/z)	نوع اتصال
۲، ۳، ۴، ۶- تترا متیل مانوز	۱/۹۶	۲۰۵،۱۶۱،۱۴۵،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۷۱،۴۵،۴۳	Man*p*-(۱→
۲، ۳، ۴- تترا متیل گلوکز	۳/۰۵	۲۰۵،۱۶۱،۱۴۵،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۷۱،۴۵،۴۳	Glc*p*-(۱→
۲، ۴، ۶- تری متیل گلوکز	۳/۱۳	۲۷۷،۲۳۳،۱۶۱،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۷۱،۴۵،۴۳	→۳)-Glc*p*-(۱→
۲، ۳، ۴- تری متیل گالاکتوز	۶/۲۴	۲۳۳،۱۸۹،۱۶۱،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۹۹،۸۷،۴۳	→۶)-Gal*p*-(۱→
۳، ۴- دی متیل گالاکتوز	۱/۹۲	۲۳۳،۱۸۹،۱۲۹،۹۹،۸۷،۴۳	→۲،۶)-Gal*p*-(۱→
۲، ۴- دی متیل گالاکتوز	۴/۰۱	۱۸۹،۱۲۹،۱۱۷،۸۷،۴۳	→۳،۶)-Gal*p*-(۱→
۲، ۳، ۴- تری متیل آرابینوز	۱/۱۲	۱۶۱،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۴۳	Ara*p*-(۱→
۲، ۴- دی متیل آرابینوز	۱/۳۱	۲۳۳،۲۰۱،۱۷۴،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۵۹،۴۳	→۳)-Ara*p*-(۱→

نتایج متیلاسیون همچنین نشان داد که واحدهای مونومری گالاکتوز با اتصالات ۶→۱ بیشترین سهم را در ساختار پلی ساکارید خالص دارند.

۴-۲-۸- طیف NMR نمونه خالص

از طیف NMR پلی ساکارید خالص برای تکمیل فرایند تعیین ساختار پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های گیاه چوبک نکائی استفاده شد. شکل ۴-۶ طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص را نشان می دهد. وجود سیگنال در نواحی ۴/۸۵، ۵/۰۵، ۵/۱۶ و ۵/۲۱ ppm به ترتیب مربوط به پروتون های آنومری β-L-Arap، α-D-Manp، α-D-Glcp و α-D-Galp است. این نتایج با نتایج حاصل از طیف مادون قرمز نمونه ها که بیانگر وجود هر دو نوع اتصال α و β در ساختار پلی ساکارید خالص بود مطابقت داشت.

طیف C-NMR پلی ساکارید خالص در شکل ۴-۷ نشان داده شده است. وجود سیگنال در نواحی ۹۴، ۱۰۰، ۱۰۱ و ۱۰۲ ppm به ترتیب نشان دهنده کربن های آنومری β-L-Arap، α-D-Glcp، α-D-Galp و α-D-Manp است. وجود تمامی این سیگنال ها بیانگر وجود اشکال پیرانوزی در ساختار تمام واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده پلی ساکارید خالص است. سیگنال در ناحیه ۸۰/۲ ppm مربوط به کربن شماره ۳ گالاکتوز است که در تشکیل انشعاب شرکت کرده است.

سیگنال های مربوط به سایر کربن ها در جدول ۴-۴ آمده است. با تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از روش‌های شیمیایی و دستگاهی که همگی تکمیل کننده یکدیگر و همسو با هم بودند می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه های گیاه چوبک نکائی یک پلی ساکارید هتروژن (هترو پلی ساکارید) است که واحدهای مونومری گالاکتوز سازنده اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص هستند و این واحدها در برخی از نقاط از محل کربن های شماره ۲ و ۳ گالاکتوز دارای انشعاب می‌شوند. تمام واحدهای مونومری آرابینوز، مانوز و گلوکز در محل شاخه ها قرار گرفته اند و شاخه‌ها توسط واحدهای مونومری ذکر شده به انتها می‌رسد. ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص استخراج شده از ریشه گیاه چوبک نکائی مطابق با شکل ۴-۸ است.

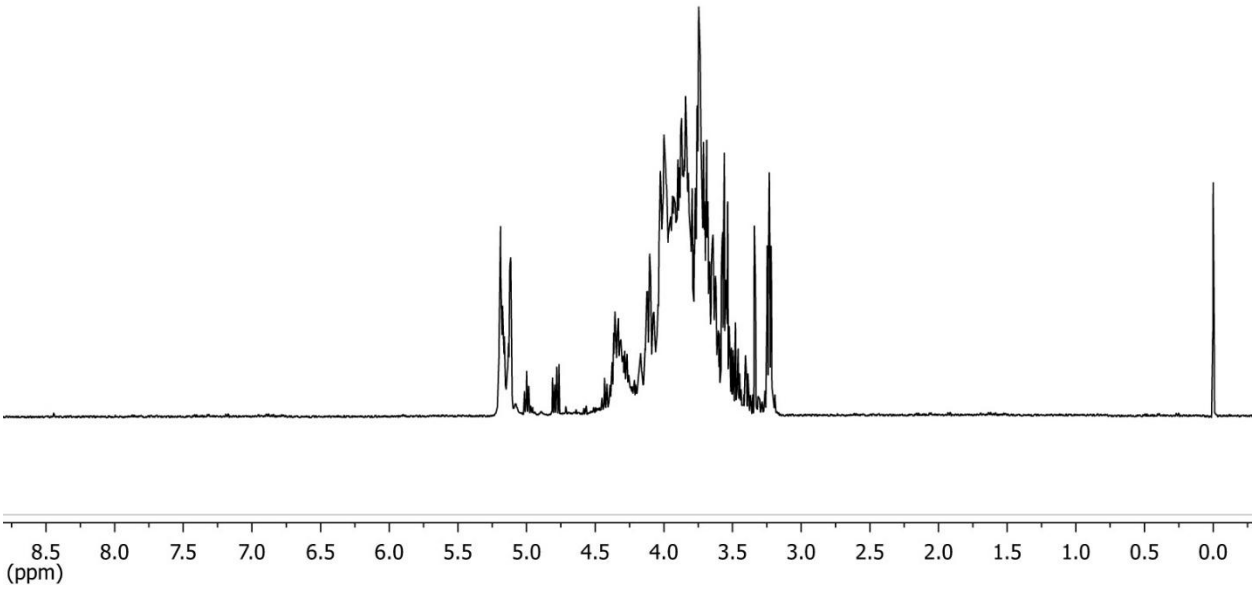
جدول ۴-۴: مقادیر جابجایی شیمیایی NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص چوبک نکائی.

واحدهای قندی	جابجایی شیمیایی، δ (ppm)					
	C-۱	C-۲	C-۳	C-۴	C-۵	C-۶
→۲،۶)-α-D-Gal*p*-(۱→	۱۰۱/۱	۷۹/۸	۷۳/۶	۶۹/۳	۷۱/۵	۶۹/۷
→۳،۶)-α-D-Gal*p*-(۱→	۱۰۱/۰	۷۲/۱	۸۰/۲	۷۱/۶	۷۱/۵	۶۹/۶
α-D-Glc*p*-(۱→	۱۰۰/۲	۷۲/۰	۷۳/۹	۷۰/۲	۷۲/۶	۶۱/۸
→۶)-α-D-Gal*p*-(۱→	۱۰۱/۱	۶۹/۵	۷۰/۶	۷۰/۱	۷۱/۳	۶۹/۶
α-D-Man*p*-(۱→	۱۰۲/۲	۷۰/۶	۷۱/۳	۶۸/۸	۷۳/۲	۶۱/۵
→۳)-β-L-Ara*p*-(۱→	۹۳/۷	۶۹/۵	۷۴/۵	۶۹/۹	۶۳/۷	------
β-L-Ara*p*-(۱→	۱۰۱/۳	۶۹/۶	۷۰/۰	۷۰/۳	۶۳/۷	------
→۳)-α-D-Glc*p*-(۱→	۱۰۰/۳	۷۱/۹	۸۳/۸	۷۱/۱	۷۳/۲	۶۱/۹

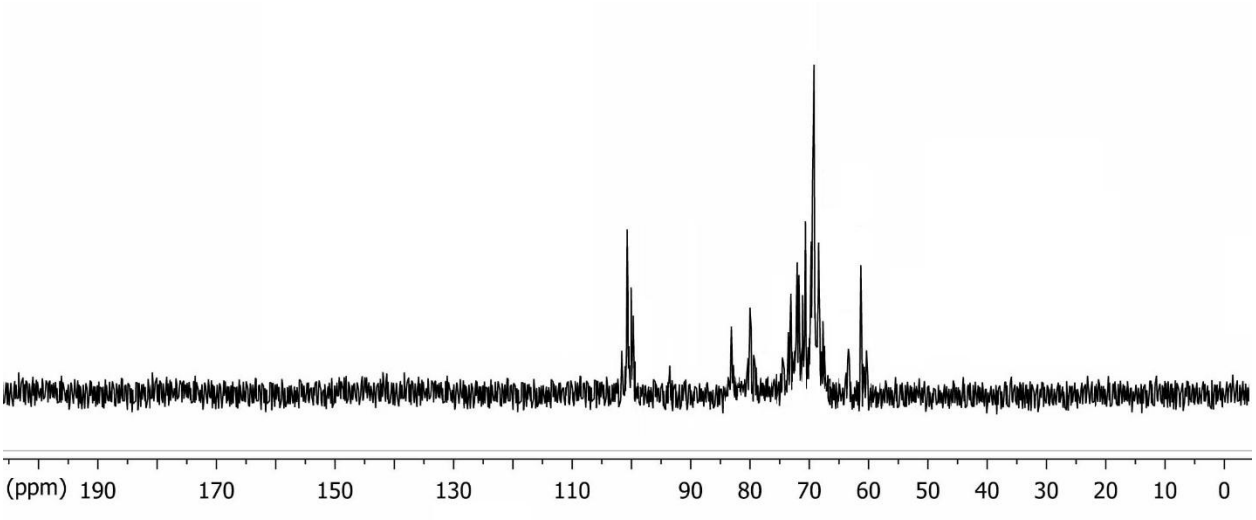
تعداد انشعابات گزارش شده برای چوبک افغانستانی و تماشایی برابر ۷، چوبک خراسانی ۹ و چوبک نکائی که در این پژوهش بررسی شد ۶ است لذا می توان عنوان نمود که چوبک نکائی نسبت به سه گونه ذکر شده از تعداد انشعابات کمتری برخوردار است. نوع واحدهای مونومری اصلی سازنده سه گونه چوبک خراسانی، افغانستانی و تماشایی مشابه و شامل گلوکز، گالاکتوز و آرابینوز است در حالیکه چوبک نکائی بررسی شده در این پژوهش علاوه بر واحدهای مونومری ذکر شده حاوی مانوز است لذا از این نظر نیز چوبک نکائی متفاوت از سه گونه دیگر است.

از نظر تعداد واحدهای مونومری موجود در شاخه ها در چوبک خراسانی و نکائی ۱۰، در چوبک افغانستانی ۹ و در چوبک تماشایی ۸ است لذا چوبک نکائی از نظر تعداد واحدهای مونومری در شاخه ها مشابه با گونه خراسانی و بیشتر از دو گونه دیگر است. برخلاف سه گونه خراسانی، افغانستانی و تماشایی که اتصال گلوکز به زنجیره اصلی از نوع (۲→۱) است در چوبک نکائی اتصال واحدهای گلوکز به یکدیگر و نیز به زنجیر اصلی پلی ساکارید از نوع (۳→۱) می باشد. در تمام گونه های مورد بررسی گالاکتوز سازنده اسکلت اصلی پلی ساکارید است و سایر واحدهای مونومری به آن متصل هستند (۳۶،۳۴،۱۴).

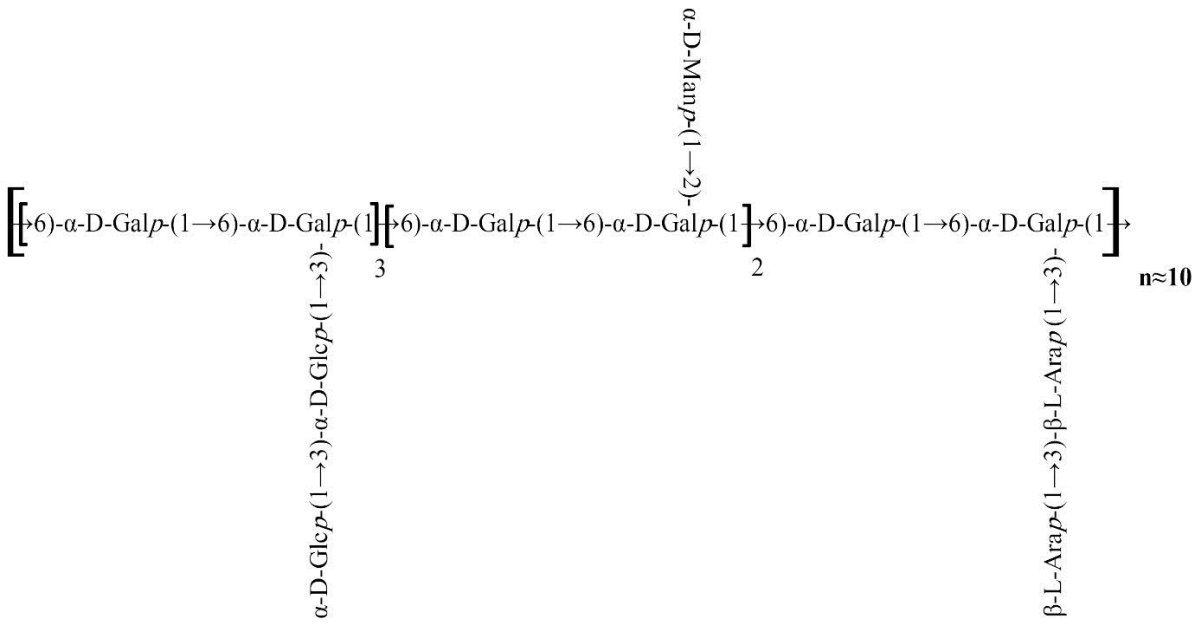
پلی ساکارید مورد نظر دارای نسبت بیشتری از واحدهای مونوساکاریدی گالاکتوز و گلوکز نسبت به واحدهای مانوز و آرابینوز است بنابراین می توان این پلی ساکارید را یک گالاکتوگلوکان نامید.



شکل ۶-۴: طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص.



شکل ۷-۴: طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص.



شکل ۴-۸: ساختار پیشنهادی برای پلی ساکارید استخراج شده از ریشه گیاه چوبک نکائی.

نتیجه گیری:

در این پژوهش جداسازی و تعیین ساختار پلی ساکارید غالب موجود در ریشه های گیاه چوبک نکائی مورد بررسی قرار گرفت. استخراج پلی ساکارید با آب گرم صورت گرفت و از ستون های کروماتوگرافی سلولزی و سفادکس برای خالص سازی پلی ساکارید استفاده شد و در نهایت پلی ساکارید خالص جداسازی شد. پلی ساکارید خالص استحصال شده فاقد پروتئین و اسیدهای نوکلئوتیک بود و درصد قند بالایی داشت. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی پلی ساکارید خالص نشان داد که از واحدهای گالاکتوز، گلوکز، آرابینوز و مانوز تشکیل شده است و مونومر غالب تشکیل دهنده آن گالاکتوز است.

ساختار پلی ساکارید توسط مجموعه ای از روش های آنالیز شیمیایی و دستگاهی مانند هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، متیله کردن، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، طیف مادون قرمز و طیف رزونانس مغناطیس هسته ای مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که واحدهای مونومری گالاکتوز سازنده اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص هستند و واحدهای مونومری گلوکز، آرابینوز و مانوز در انشعابات پلی ساکارید خالص قرار گرفته اند. لذا می توان نتیجه گرفت که پلی ساکارید غالب حاصل از ریشه های گیاه چوبک نکائی یک پلی ساکارید نسبتاً منشعب است.

از آنجائیکه ویژگی های عملکردی پلی ساکاریدها ارتباط زیادی به ساختار آنها دارد لذا انتظار می رود با معرفی ساختار این پلی ساکارید گامهای موثری در تفسیر ویژگی های عملکردی آن برداشته شده و اطلاعات این پایان نامه جهت بررسی سایر پژوهشگران در دانشگاه ها و صنایع مفید واقع شود. بررسی ویژگی های فیزیکی محلول های پلی ساکاریدی چوبک نکائی جهت کاربرد در صنایع غذایی و سایر صنایع وابسته توصیه می شود.

منابع:

۱. امین غ، (۱۳۷۰) "*گیاهان داروئی سنتی ایران*" جلد اول، معاونت پژوهشی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی.
۲. آئینه چی ی، (۱۳۷۰) "*مفردات پزشکی و گیاهان داروئی ایران*" چاپ دوم، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.
۳. جهان بین ک، (۱۳۹۰)، رساله دکتری: استخراج و خالص سازی یک پلی ساکارید جدید از ریشه های گیاه چوبک تماشایی" دانشگاه تهران.
۴. صمصام شریعت س، (۱۳۸۶) "*عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی*" چاپ دوم، انتشارات مانی.
۵. عماد م، (۱۳۷۹) "*شناسایی گیاهان دارویی و صنعتی جنگلی و مرتعی و موارد مصرف آنها*" جلد پنجم، چاپ اول، انتشارات موسسه توسعه روستایی.
۶. قهرمان ا، (۱۳۷۹) "*فلور رنگی ایران*" موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع-بخش گیاهشناسی.
۷. مظفریان و، (۱۳۷۵) "*فرهنگ نامهای گیاهان ایران*" انتشارات فرهنگ معاصر.
۸. مقدم م، (۱۳۸۴) "مرتع و مرتع داری" چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران.
۹. میر حیدر ح، (۱۳۷۳) "*معارف گیاهی*" چاپ اول، دفتر نشر فرهنگ اسلامی.
۱۰. نراقی م، (۱۳۸۲) "*نسخه های شفابخش از سبزی ها و میوه ها*" چاپ پنجم، مترجم، چاپخانه سپهر.

11. Aghel, N., Moghimipour, E., & Raies Dana, A. (2007). Formulation of a herbal shampoo using total saponins of Acanthophyllum squarrosum. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 167-172.
12. Arifkhodzhaev, A. O. (1997). Polysaccharides of saponin-bearing plants. X. An investigation of the carbohydrates of *Acanthophyllum pungens*. *Chemistry of natural compounds*, *33*(5), 536-538.
13. Arifkhodzhaev, A. O., Kurbanova, A. D., & Rakhimov, D. A. (1999). Polysaccharides of saponin-bearing plants XI. An investigation of the polysaccharides of *Acanthophyllum knorringianum*. *Chemistry of natural compounds*, *35*(2), 150-151.
14. Arifkhodzhaev, A. O., Kurbanova, A. D., Rakhimov, D. A., & Shashkov, A. S. (2003). Polysaccharides of saponin-bearing plants. XIV. Structural study of

glucoarabinogalactan from *Acanthophyllum pungens* roots. *Chemistry of natural compounds*, *39*(2), 154-157.

15. 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.

16. Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009), "Food Chemistry", 4th revised and extended edn. *Heidelberg, Germany*, 62-63.

17. Benhura, M. A. N., & Chidewe, C. (2002). Some properties of a polysaccharide preparation that is isolated from the fruit of Cordia abyssinica. *Food chemistry*,*76*(3), 343-347.

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

19. Chen, R., Li, H., Li, S., Jin, C., & Lu, J. (2015). Extraction optimization, preliminary characterization and immunological activity of polysaccharides from *figs*. *International journal of biological macromolecules*, *72*, 185-194.

20. 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 japonicas*. *Carbohydrate polymers*, 83(2), 749-754.

21. 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. *Carbohydrate polymers*, *96*(1), 101-108.

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

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

24. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

25. Duenas-Chasco, M. T., Rodriguez-Carvajal, M. A., Mateo, P. T., Franco-Rodriguze, G., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A., & Gil-Serrano, A. M. (1997). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate research*, 303(4), 453-458.

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

27. Fennema, O. R. (1996), *"Food Chemistry*", New York: Marcel Dekker, Inc.

28. Frank, A. L. (1983), "*Basic food chemistry*", CRC Press.

29. 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.
30. He, Z., Liang, F., Zhang, Y., & Pan, Y. (2014). Water-soluble polysaccharides from finger citron fruits (citrus medica L.var. sarcodactylist). *Carbohydrate research.* In press, accepted manuscript.
31. Heinze, T. (2005), "*Polysaccharides I: Structure, characterisation and use*", Springer Verlag.
32. Hu, C., Kong, Q., Yang, D., & Pan, Y. (2011). Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from *Eremurus anisopterus* (Ker. Et Kir) Regal roots. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 402-406.
33. Hu, H., Liang, H., & Wu, Y. (2015). Isolation, purification and structural characterization of polysaccharide from Acanthopanax brachypus. *Carbohydrate polymers*, *127*, 94-100.
34. Jahanbin, K., Gohari, A. R., Moini, S., Emam-Djomeh, Z., & Masi, P. (2011). Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots. *International journal of biological macromolecules*, *49*(4), 567-572.
35. Jia, X., Ding, C., Yuan, S., Zhang, Z., Chen, Y. E., Du, L., & Yuan, M. (2014). Extraction, purification and characterization of polysaccharides from *Hawk tea*. *Carbohydrate polymers*, *99*, 319-324.
36. Kurbanova, A. D., Arifkhodzhaev, A. O., Rakhimov, D. A., & Shashkov, A. S. (2003). Polysaccharides of saponin-bearing plants. XV. Structure of glucoarabinogalactan from *Acantophyllum Borszczowii* roots. *Chemistry of natural compounds*, *39*(5), 438-441.
37. Kurbanova, A. D., Arifkhodzhaev, A. O., Rakhimov, D. A., Kristallovich, E. L., Vakhabov, A. A., & Khushbaktova, Z. A. (2002). Polysaccharides of saponin-bearing plants. XII. Polysaccharides of *Acantophyllum knorringianum* and their biological activity. *Chemistry of natural compounds*, *38*(5), 407-409.
38. Li, F., Cui, S. H., Zha, X. Q., Bansal, V., Jiang, Y. L., Asghar, M. N., & Luo, J. P. (2015). Structure and bioactivity of a polysaccharide extracted from protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. *International journal of biological macromolecules*, *72*, 664-672.
39. Li, F., Yuan, Q., & Rashid, F. (2009). Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bag. *Carbohydrate polymers*, 78(1), 80-88.
40. Lue, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., Lue, A., & Chun, Z. (2010). Purification composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharide from *Dendrobium* nobile Lindl. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1014-1019.
41. Luo, D. (2008). Identification of structure and antioxidant activity of a fraction of polysaccharide purified from *Dioscorea nipponica* Makino. *Carbohydrate polymers*, 71(4), 544-549.

42. Muralikrishna∗, G., & Subba Rao, M. V. S. S. T. (2007). Cereal non-cellulosic polysaccharides: Structure and function relationship an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, *47*(6), 599-610.

43. Needs, P. W., & Selvendran, R. R. (1993). Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydrate research*, 245, 1-10.

44. Nielsen, S. S. (2010), "*Food analysis",* p. 550, New York, NY, USA, Springer.

45. Parsa, A. (1951), "Flore de l'Iran", *Teheran: Teheran university*.

46. Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., & Vyvyan, J. (2008), "*Introduction to spectroscopy*", Cengage Learning.

47. Ray, B. (2006). Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. *Carbohydrate polymers*, 66(3), 408-416.

48. Schiman-Czeika, H. (1988), "Acanthophyllum", wine: Graz.

49. Seedevi, P., Moovendhan, M., Sudharsan, S., Vasanthkumar, S., Srinivasan, A., Vairamani, S., & Shanmugam, A. (2014). Structural characterization and Bioactivities of sulfated polysaccharide From *Monostroma oxyspermum*. *International journal of biological macromolecules*. In press, accepted manuscript.

50. Staub, A. M. (1965). Removal of protein-Sevag method. *Methods in carbohydrate chemistry*, *5*(2), 5-6.

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

52. 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. *Carbohydrate polymers*, 79(1), 180-183.

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

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

55. Wang, Y., Yin, H., Lv, X., Wang, Y., Gao, H., & Wang, M. (2010). Protection of chronic renal failure by a polysaccharide from *Cordyceps sinensis*. *Fitoterapia*, 81(5), 397-402.

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

57. 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.
58. 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.
59. Xie, X., Wang, J., & Zhang, H. (2015). Characterization and antitumor activities of a water-soluble polysaccharide from Ampelopsis megalophylla. *Carbohydrate Polymers*, *129*, 55-61.
60. Yang, L., & Zhang, L. M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate polymers*, *76*(3), 349-361.
61. Yang, W., Wang, Y., Li, X., & Yu, P. (2014). Purification and structural characterization of *Chinese yam* polysaccharide and its activities. *Carbohydrate Polymers*. In press, accepted manuscript.
62. Yildiz, F. (2009), "*Advances in food biochemistry*", CRC press.
63. 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*. *Carbohydrate polymers*, 82(3), 543-548.
64. You, Q., Yin, X., & Ji, C. (2014). Pulsed counter-current ultrasound-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Boletus edulis*. *Carbohydrate polymers*, *101*, 379-385.
65. You, Q., Yin, X., Zhang, S., & Jiang, Z. (2014). Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum Imai*. *Carbohydrate polymers*, *99*, 1-10.
66. Yu, R., Yin, Y., Yang, W., Ma, W., Yang, L., Chen, X., Zhang, Z., Ye, B., & Song, L. (2009). Structural elucidation and biological activity of a novel polysaccharide by alkaline extraction from cultured *cordyceps militaris*. *Carbohydrate polymers*, 75(1), 166-171.
67. 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. *Carbohydrate Polymers*, *87*(3), 2279-2283.
68. Zhang, L., Zhang, W., Wang, Q., Wang, D., Dong, D., Mu, H., & Duan, J. (2014). Purification, antioxidant and immunological activities of polysaccharides from *Actinidia Chinensis* roots. *International journal of biological macromolecules*. In press, accepted manuscript.
69. 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* C. A. Meyer. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 544-552.
70. Zhao, G., Kan, J., Li, Z., & Chen, Z. (2005). Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposite* Thunb roots. *Carbohydrate Polymers*, 61(2), 125-131.

Abstract:

A new water-soluble polysaccharide with molecular weight of 35.2 KDa and a specific optical Rotation of + 178.5° was extract by warm water (50C°) from the roots of *Acanthophyllum glandulosum*. The polysaccharide purified through DEAE-cellulose and Sephadex G-100 columns. Total yields of crude and purified polysaccharides were 3.45% and 2.38% respectively. The purified polysaccharides had no absorption at 280 nm (Detected by UV Spectrum). Total carbohydrate content of purified polysaccharide was 98.2% Monosaccharide analysis by GC revealed that polysaccharide was composed of Glucose, Galactose, Arabinose and Mannose with a relative molar ratio of 2.9: 6.1: 0.9: 1.0 respectively. Its structural features were elueidated by a combination of chemical and analytical methods such as methylation, partial acid hydrolysis, periodate oxidation and smith degradation, FT-IR and ^{13}C and ^{1}H NMR Spectroscopy. The data obtained indicate that polysaccharide possessed a backbone of α-(1→6)-linked Galactose with branched attached to O-2 by α-1-linked Mannose and at O-3 by α-(1→3)-linked Glucose and by α-(1→3)-linked Arabinose.

Keywords: *Acanthophyllum glandulosum*, polysaccharide, Structural elucidation, Extraction and Purification

University of Shahrood

Faculty of agriculture

Structural characterization of the main water-soluble polysaccharide from *Acantophyllum glandulosum* roots

Mohammad molavisy

Supervisor:

Kambiz Jahanbin

October 2015