

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

رشته مهندسی کشاورزی گرایش صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

**تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه تمشک برگ**

**نارونی**

نگارنده: ندا صحراگرد

استاد راهنما:

دکتر کامبیز جهان بین

شهریور ۱۳۹۵

دانشگاه شاهرود

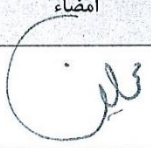
دانشکده کشاورزی

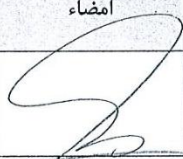


گروه : صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای / خانم ندا صحراگرد به شماره دانشجویی: ۹۳۱۱۰۴۴

تحت عنوان: تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه تمشک برگ نارونی.

در تاریخ ۹۵/۶/۱۶ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- صنایع غذایی مورد ارزیابی و با درجه بسیار خوب مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی : کامبیز جهان بین
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی : وجیهه درستکار		نام و نام خانوادگی : حمیدرضا صمدلوئی
			نام و نام خانوادگی : احمد رجایی

چراغ دل به نور جان برافروخت

به نام آنکه جان را فکرت آموخت

ز فیضش خاک آدم گشت گلشن

ز فضلش هر دو عالم گشت روشن

ز کاف و نون پدید آورد کونین

توانایی که در یک طرفه العین

هزاران نقش بر لوح عدم زد

چو قاف قدرتش دم بر قلم زد

وز آندم شد هویدا جان آدم

از آن دم گشت پیدا هر دو عالم

«گلشن راز، شیخ محمود شبستری»

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم

به تمامی جویندگان علم و دانش این مرزوبوم، به امید آنکه یک گام بسیار کوچک برای کمک به این بزرگواران باشد و اجر این توفیق هدیه ای باشد، به آنان که مهر آسمانشان، آرام‌بخش آلام زمینی‌ام است.

پدر و مادر عزیزم

## گریه شام و سحر شکر که ضایع نگشت

## قطره باران ما گوهر یکدانه شد

(حافظ)

با سپاس و ستایش خدای بزرگ که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

شایسته است که از آقای دکتر کامبیز جهان‌بین؛ استاد فرزانه که با نکات دلاویز و در کمال فروتنی، گلشن‌سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کارساز و سازنده خود بارور ساختند و هیچ کمکی را در این عرصه بر من دریغ نداشتند و در راه کسب علم مرا یاری نموده‌اند تقدیر و تشکر نمایم.

همچنین از اساتید و داوران آقایان دکتر احمد رجایی و دکتر حمیدرضا صمدلویی که زحمت داوری این پایان‌نامه را برعهده گرفتند، نماینده تحصیلات تکمیلی، خانم دکتر وجیهه درستکار و مدیر گروه صنایع غذایی آقای دکتر مسعود حکیمی‌تبار کمال تشکر را دارم.

از تمام دوستانی که در به پایان رساندن این رساله مرا یاری نمودند آقایان و خانم‌ها:

دکتر ولی‌الله مظفریان، حسن بهره‌ساز، حسین بهره‌ساز، سودابه صحراگرد، مژگان سنجرى، محمدعلی واقف، پریسا رجیبی، ندا سلیمی، مهلا آهنگر، مریم آهنگ، آرزو ذوقی و همچنین کارکنان محترم کتابخانه مرکزی دانشگاه صنعتی شاهرود، کتابخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، کتابخانه دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، کتابخانه مرکزی دانشگاه تربیت مدرس، کتابخانه اسناد مرکزی دانشگاه تهران، کتابخانه دانشکده فنی دانشگاه تهران، کتابخانه دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، کتابخانه دانشکده علوم پایه دانشگاه تهران، حراست محترم باغ موزه گیاه‌شناسی (باغ ملی ایران)، مسئولین آزمایشگاه‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، حراست دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود و ساکنان محترم منطقه دره توت شهرستان کرج تشکر می‌کنم.

## تعهدنامه

اینجانب ندا صحراگرد دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، نویسنده پایان نامه " تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه تمشک برگ نارونی" تحت راهنمایی آقای دکتر کامبیز جهان بین متعهد می شوم:

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

## چکیده:

پلی ساکارید محلول در آب ریشه‌های تمشک برگ نارونی با استفاده از آب  $70^{\circ}\text{C}$  استخراج و با ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز-۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ خالص‌سازی شد. همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص بوسیله کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا تعیین شد. ساختار پلی ساکارید خالص نیز بر اساس درجه چرخش نوری، واحدهای مونومری سازنده، متیله کردن، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته و مادون قرمز مشخص شد. نتایج آزمایشات نشان داد که پلی ساکارید ریشه‌های تمشک برگ نارونی یک هتروپلی ساکارید اسیدی حاوی گلوکز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک به نسبت‌های مولی به ترتیب  $6/2$ ،  $1/0$  و  $1/2$  با درجه چرخش نوری  $+196^{\circ}$  و میانگین وزن مولکولی  $7900$  دالتون است. زنجیر اصلی پلی ساکارید خالص ریشه‌های تمشک برگ نارونی از واحدهای گلوکوپیرانوز با اتصالات  $(1 \rightarrow 4)$   $\alpha$  تشکیل شده و در محل کربن شماره ۶ گلوکز شاخه‌های جانبی  $\alpha$ -D-گالاکتوپیرانوز (۱) ← و اسید  $\alpha$ -D-گلوکورونیک (۱) ← قرار گرفته است.

**واژگان کلیدی:** هتروپلی ساکارید اسیدی، تمشک برگ نارونی، استخراج، خالص‌سازی، تعیین ساختار.

## پیش‌گفتار

در عصر حاضر توجه اکثر دانشمندان و محققان به طبیعت و یافتن پاسخ سؤالات خود جلب شده است. در گذشته نیز در پاره‌ای از موارد با الگوبرداری، شبیه‌سازی و الهام از طبیعت در حل مسائل مربوط به علوم مختلف مواجه شده‌ایم؛ اما در حال حاضر در برخی رشته‌ها مانند نجوم، هوانوردی، زیست‌شناسی و غیره به شکل جدی‌تر و پرنگ‌تر این قضیه به چشم می‌خورد. علم گیاه‌شناسی، داروسازی و مواد غذایی نیز از این امر مستثنی نیست و در سال‌های اخیر شاهد تغییر نگرش دانشمندان از تولید و ساخت ترکیبات مصنوعی به سمت طبیعت و استفاده از گیاهان در موارد مختلف و مصارف گوناگون آن‌ها هستیم. لذا با اهمیت یافتن گیاهان در سایر نقاط کره زمین، کشت، فروش و حتی صدور گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته و منجر به افزایش رونق اقتصادی شده است. گیاهان موجود در کره زمین عموماً در چهار منطقه ایران و توران، اروپا و سیبری، صحرا و عربستان و منطقه سند و سودان رویش دارند. کشور ایران با مساحت تقریبی  $1/873/959$  کیلومتر مربع، از مهم‌ترین مناطق ذکر شده است؛ که به علت گستردگی و موقعیت کوه‌ها و ارتفاعات مختلف (اختلاف ارتفاع حدود  $5652$  متر و اختلاف دمای  $80^{\circ}C$ ) به ناحیه‌ای مناسب برای رشد حدود  $8000$  گونه گیاهی تبدیل شده است. اکثر این گیاهان در ۴ ناحیه مختلف ایران شامل خزر، ارمنستان و زاگرس، فلات مرکزی، خلیج و عمان رویش دارند (اسدی، ۱۳۶۷). هر کدام از نواحی ذکر شده شرایط اقلیمی و ویژگی‌های منحصری‌فرد خود را داراست. لذا انواع گیاهان با شرایط و نیازهای آب‌وهوایی متفاوت قادر به رشد در نواحی ذکر شده هستند. در حال حاضر علاوه بر کشت و صادرات خرما و زعفران، کشت و صادرات سایر گیاهان مانند زیره سبز، آویشن، بادرنجبویه، بابونه، اسفرزه، بومادران، گل‌ختمی، مریم‌گلی، کتیرا، شیرین‌بیان، تلخ‌بیان، سقز، علف‌گاوزبان، آنغوزه و باریجه، گزعلفی، شکر تیغال، برگ‌کنار و حنا به دلیل خواص دارویی و درمانی و نیاز بازار گسترش یافته است. عمده صادرات گیاهی ایران به کشورهای آلمان، آمریکا، انگلستان، فرانسه، مجارستان، پاکستان، هند، چین، ترکیه، بحرین، کویت، قطر، کانادا، سوئیس، سوئد، لبنان، ایتالیا و امارات است. امروزه ارزش تجارت جهانی گیاهان دارویی حدود صد میلیارد دلار



در سال و طبق پیش‌بینی سازمان خواربار جهانی این میزان برای سال ۲۰۵۰ میلادی تقریباً معادل پنج تریلیون دلار است. لذا حفظ، نگهداری و گسترش این پوشش گیاهی بسیار حائز اهمیت است. در گذشته درمان بسیاری از بیماری‌ها به کمک انواع ضمادها، دمنوش‌ها و عصاره گیاهان صورت می‌گرفت. خوشبختانه اکنون علم داروسازی با نگاهی دقیق‌تر و به صورت علمی‌تر به مطالعه و پژوهش در طب سنتی پرداخته است. لذا، لازمه این امر، اهتمام به استخراج و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اجزای گیاهان است تا از این طریق علت و دلیل مصرف بسیاری از گیاهان در گذشته شناسایی شود.

گیاه تمشک<sup>۱</sup> (میوه آن نیز به همین نام خوانده می‌شود) از گیاهان مهم و با ارزش تغذیه‌ای بالاست. در گذشته برگ‌های آن مورد توجه پزشک و دانشمند بزرگ، ابوعلی‌سینا، در امر طبابت بوده است. میوه آن مصرف تازه‌خوری دارد و در تولید انواع محصولات غذایی مانند بستنی، ماست‌های میوه‌ای، کیک، ژله و دسر مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعاتی بر روی پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی گونه تمشک فروتیکوسوس<sup>۲</sup> و پلی‌ساکارید ریشه گیاه تمشک گونه کراتاجیفولیوس<sup>۳</sup> صورت گرفته است (کارتیر<sup>۴</sup> و همکاران، ۱۹۸۷-۸۸؛ نی<sup>۵</sup> و همکاران، ۲۰۰۹)، همچنین، پلی‌ساکارید میوه و برگ تمشک چینجی‌هو<sup>۶</sup> و پلی‌ساکارید محلول در آب میوه تمشک آیدیئوس<sup>۷</sup> خالص‌سازی شده است (ژانگ<sup>۸</sup> و همکاران، ۲۰۱۵؛ یو<sup>۹</sup> و همکاران، ۲۰۱۵). بر اساس نتایج تحقیقات، پلی‌ساکاریدهای ریشه این جنس از گیاه قابلیت استفاده و بهره‌وری در صنعت غذا را دارا هستند. همچنین، مطالعاتی بر روی ترکیبات ضد اکسندگی و قندهای محلول در طی بلوغ میوه تمشک در شمال کشور انجام گرفته است. لذا، با توجه به اهمیت و کارایی بالای پلی‌ساکاریدها به شکل ماده اصلی و یا افزودنی در صنعت غذا و

---

<sup>۱</sup> *Rubus* L.

<sup>۲</sup> *R. fruticosus*

<sup>۳</sup> *R. crataegifolius*

<sup>۴</sup> Cartier

<sup>۵</sup> Ni

<sup>۶</sup> *R. chingii* Hu

<sup>۷</sup> *R. idaeus* L.

<sup>۸</sup> Zhang

<sup>۹</sup> Yu

همچنین گستردگی و پراکندگی گونه تمشک برگ نارونی<sup>۱</sup> در شمال، مرکز، شرق و غرب ایران و سایر  
علل ذکر شده در بالا، تصمیم به شناسایی پلی ساکاریدهای ریشه تمشک برگ نارونی گرفتیم، تا بدین  
ترتیب صنعت غذا را همچون داروسازی از کاربرد و مصرف مواد شیمیایی دور ساخته و به سمت تولید  
مواد خوراکی عاری از افزودنی‌های شیمیایی پیش ببریم و منبع جدیدی از پلی ساکاریدهای مناسب را  
به منظور جانشینی برای ترکیبات نامناسب، غنی‌سازی مواد خوراکی و تولید غذاهای فراسودمند،  
افزایش کیفیت محصولات غذایی، افزایش زمان ماندگاری، بهبود بافت و حفظ عطر و طعم در  
محصولات غذایی، توسعه و پیشبرد صنایع نوشیدنی و تولید چاشنی‌های با ارزش غذایی بالاتر،  
شناسایی و معرفی کنیم.

به امید تولید و مصرف مواد غذایی بی ضرر و سالم‌تر در آینده‌ای نزدیک و ارتقای سلامت جامعه.

---

<sup>۱</sup> *R. anatolicus*

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

- 1- Isolation and yield determination of a new polysaccharide from *Rubus anatolicus* roots
- 2- Monosaccharide composition of a new water-soluble polysaccharide from *Rubus anatolicus* roots

## فهرست مطالب:

۱	فصل اول کلیات.....
۲	۱-۱-۱- کربوهیدرات‌ها.....
۳	۱-۱-۲- نام‌گذاری کربوهیدرات‌ها.....
۷	۱-۱-۳- پلی‌ساکاریدها.....
۷	۱-۳-۱-۱- تعریف.....
۹	۱-۳-۱-۲- انواع پلی‌ساکاریدها.....
۱۰	۱-۳-۱-۳- انواع اتصالات مونومری در پلی‌ساکاریدها.....
۱۲	۱-۳-۱-۱- پلی‌ساکاریدهای محلول در آب یا هیدروکلونیدها.....
۱۴	۱-۳-۱-۲- پلی‌ساکاریدهای نامحلول در آب.....
۱۴	۱-۴-۱- اهمیت و کارایی پلی‌ساکاریدها در صنایع غذایی.....
۱۵	۱-۲- استخراج پلی‌ساکاریدها.....
۱۵	۱-۱-۲-۱- کاهش اندازه اندام‌های گیاه.....
۱۶	۱-۲-۱-۲- استخراج توسط حلال.....
۱۶	۱-۲-۱-۳- صاف کردن.....
۱۷	۱-۲-۱-۴- تغلیظ نمونه.....
۱۷	۱-۲-۱-۵- خشک کردن نمونه.....
۱۷	۱-۲-۲- روش‌های استخراج پلی‌ساکاریدها.....
۱۹	۱-۲-۲-۱- حلال پلی‌ساکاریدها.....
۲۰	۱-۳- خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها.....
۲۱	۱-۳-۱- هضم پروتئین‌ها.....
۲۳	۱-۴- حذف سایر ناخالصی‌ها.....
۲۵	۱-۵- ترسیب پلی‌ساکاریدها.....
۲۵	۱-۶- شناخت و تشخیص ساختمان شیمیایی مولکولی.....
۲۸	۱-۶-۱- روش‌های شیمیایی.....
۲۸	۱-۶-۱-۱- تعیین وزن مولکولی.....
۲۹	۱-۶-۱-۲- تعیین مونوساکاریدهای سازنده.....

۳۰	..... کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)
۳۱	..... کروماتوگرافی گازی (GC)
۳۴	..... تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی
۳۴	..... متیله کردن
۳۵	..... هیدرولیز ناقص اسیدی (ملایم)
۳۶	..... اکسایش پدیدات
۳۷	..... روش های آنزیمی
۳۸	..... روش های طیفسنجی
۳۸	..... درجه چرخش نوری (پلامتری)
۳۹	..... طیفسنجی فرابنفش و مرئی
۳۹	..... طیفسنجی مادون قرمز
۴۰	..... طیفسنجی رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR)
۴۲	..... گیاه تمشک
۴۲	..... مقدمه
۴۵	..... خصوصیات اکولوژیکی و تاکسونومی گیاه
۴۶	..... موارد مصرف و کاربرد تمشک
۴۷	..... تمشک برگ نارونی
۴۹	..... ترکیبات شیمیایی جنس تمشک و گونه تمشک برگ نارونی
۵۱	..... <b>فصل دوم: بررسی منابع</b>
۵۲	..... ۱-۲ استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها
۵۶	..... ۲-۲ شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها
۶۱	..... <b>فصل سوم: مواد و روش ها</b>
۶۲	..... ۱-۳ مواد اولیه و محلول های شیمیایی
۶۲	..... ۱-۱-۳ جمع آوری نمونه
۶۳	..... ۲-۱-۳ مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده
۶۳	..... ۳-۱-۳ دستگاه های مورد استفاده
۶۴	..... ۲-۳ روش کار

۶۴	..... ۱-۲-۳- استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی.....
۶۴	..... ۱-۱-۲-۳- جداسازی ترکیبات چربی دوست.....
۶۵	..... ۲-۱-۲-۳- استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از نمونه.....
۶۵	..... ۳-۱-۲-۳- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از نمونه محلول.....
۶۵	..... ۲-۲-۳- خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب.....
۶۶	..... ۳-۲-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکارید محلول در آب.....
۶۶	..... ۱-۳-۲-۳- طیف فرابنفش پلی ساکارید خالص.....
۶۶	..... ۲-۳-۲-۳- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید.....
۶۷	..... ۳-۳-۲-۳- اندازه گیری درجه چرخش نوری.....
۶۷	..... ۴-۳-۲-۳- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید.....
۶۹	..... ۵-۳-۲-۳- بررسی طیف مادون قرمز پلی ساکارید.....
۶۹	..... ۶-۳-۲-۳- هیدرولیز ناقص اسیدی.....
۷۰	..... ۷-۳-۲-۳- اکسیداسیون پیریدات و تجزیه اسمیت.....
۷۱	..... ۸-۳-۲-۳- متیله کردن پلی ساکاریدهای خالص.....
۷۲	..... ۹-۳-۲-۳- طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR).....
۷۳	..... <b>فصل چهارم: نتایج و بحث</b> .....
۷۴	..... ۱-۴- استخراج و خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب.....
۷۵	..... ۲-۴- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص.....
۷۷	..... ۳-۴- تعیین درجه چرخش نوری.....
۷۷	..... ۴-۴- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص.....
۷۹	..... ۵-۴- طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص.....
۸۱	..... ۶-۴- اکسیداسیون پیریدات و تجزیه اسمیت.....
۸۲	..... ۷-۴- متیله کردن.....
۸۳	..... ۸-۴- هیدرولیز ناقص اسیدی.....
۸۴	..... ۹-۴- طیف رزونانس مغناطیس هسته های پروتون و کربن.....
۸۴	..... ۱-۹-۴- طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص.....
۸۵	..... ۲-۹-۴- طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص.....
۸۹	..... نتیجه گیری کلی.....

۹۱ ..... پیوست‌ها

۱۰۱ ..... منابع

## فهرست اشکال:

- شکل ۱-۱: اشکال مونوساکاریدها بر اساس طرح حلقوی هاورث..... ۶
- شکل ۲-۱: تعداد مونومرها در ساختار الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها و تفاوتشان با سایر کربوهیدراتها..... ۷
- شکل ۳-۱: ساختار یک پلی ساکارید منشعب..... ۸
- شکل ۴-۱: بخشی از ساختارهای فرضی فیبرهای رژیمی..... ۱۰
- شکل ۵-۱: فیلتراسیون ژلی با سفارز 4B از عصاره آبی آرد گندم حاوی آرابینوزیلان و آرابینوگالاکتان-پیتید..... ۲۵
- شکل ۶-۱: تأثیر مدت زمان هیدرولیز بر تخمین ترکیبات کربوهیدراتی دیواره سلولی لوبیای پینتو-هیپوکوتیلیس..... ۳۰
- شکل ۷-۱: شمای اجزای دستگاه GC..... ۳۲
- شکل ۸-۱: آنالیز GC پلی ساکارید دیواره سلولی افرای شبه چناری..... ۳۳
- شکل ۹-۱: تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل قادر به متیله شدن در یک پلی ساکارید خاص..... ۳۵
- شکل ۱۰-۱: شمایی از اجزای دستگاه NMR..... ۴۱
- شکل ۱۱-۱: میوه، ساقه، گل و برگ‌های تمشک برگ نارونی..... ۴۸
- شکل ۱-۲: ساختار پلی ساکارید ریشه تمشک کراتاجیفولیوس..... ۵۹
- شکل ۱-۳: ریشه‌های گیاه تمشک برگ نارونی در خاک..... ۶۲
- شکل ۲-۳: ریشه‌های تمیز شده..... ۶۲
- شکل ۳-۳: ریشه‌های برش خورده..... ۶۲
- شکل ۴-۳: ریشه‌های پرک شده..... ۶۳
- شکل ۱-۴: پلی ساکارید ناخالص و خالص حاصل از ریشه‌های گیاه تمشک برگ نارونی..... ۷۴
- شکل ۲-۴: منحنی پلی ساکارید خالص حاصل از فراکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون سفادکس جی-۱۰۰..... ۷۵
- شکل ۳-۴: کروماتوگرام پلی ساکارید خالص با استفاده از دستگاه HPGPC..... ۷۶
- شکل ۴-۴: کروماتوگرام گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص و خالص احیا شده..... ۷۹
- شکل ۵-۴: طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی..... ۸۰
- شکل ۶-۴: طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص..... ۸۵
- شکل ۷-۴: طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص..... ۸۶
- شکل ۸-۴: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی..... ۸۷



## فهرست جداول:

۴	جدول ۱-۱: درصد کربوهیدرات مواد غذایی مختلف.....
۵	جدول ۲-۱: نام‌های رایج و سیستماتیک برخی از قندها.....
۱۳	جدول ۳-۱: منابع تولید هیدروکلوئیدهای مهم تجاری.....
۱۳	جدول ۴-۱: مقدار و هزینه هیدروکلوئیدهای مهم خوراکی وارداتی در سال ۱۳۹۴.....
	جدول ۱-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص
۸۲	حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی.....
۸۲	جدول ۲-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی پلی ساکارید خالص متیله شده.....
۸۴	جدول ۳-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص.....
۸۵	جدول ۴-۴: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR پروتون پلی ساکارید خالص.....
۸۶	جدول ۵-۴: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR کربن-۱۳ پروتون پلی ساکارید خالص.....



فصل اول:

کلیات

## ۱-۱- کربوهیدرات‌ها

غلات بیشترین مصرف را در میان انواع مواد خوراکی مورد مصرف انسان‌ها دارد لذا، بخش اعظم انرژی مورد نیاز انسان‌ها از طریق مصرف کربوهیدرات‌ها تأمین می‌شود. کربوهیدرات‌ها در حدود ۹۰٪ از ماده خشک گیاهان کره زمین را تشکیل می‌دهند و با توجه به دسترسی آسان و ارزانی و نیز انرژی زیاد حاصل از مصرف‌شان (تأمین ۷۰-۸۰٪ از کالری رژیم غذایی مصرف‌کنندگان) نقش مهمی را در تغذیه موجودات زنده ایفا می‌کنند. کربوهیدرات‌ها به سه دسته مونوساکاریدها، الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها تقسیم‌بندی می‌شوند که پلی‌ساکاریدها نسبت به دو مورد دیگر اهمیت بیشتری دارند. برخی از پلی‌ساکاریدها مانند سلولز، همی‌سلولز و پکتین در دسته فیبرهای غذایی قرار می‌گیرند؛ زیرا از دستگاه گوارش انسان بدون تغییر خارج می‌شوند (بمیلر<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۸؛ فاطمی، ۱۳۸۶). اثرات فیزیولوژیکی فیبرهای غذایی در دستگاه گوارش به مقدار و تنوع آن‌ها بستگی دارد لذا، تأثیر هر کدام از آن‌ها، با توجه به نوع و مقدار فیبر موجود مشخص می‌شود. به علاوه، فیبرهای رژیمی دارای ویژگی‌های عملکردی مهمی مانند حلالیت و ظرفیت نگهداری آب<sup>۲</sup>، هستند که باعث شده است آن‌ها را بر اساس حلالیت در آب، تقسیم‌بندی کنند. مؤسسه علوم ملی ایالات متحده<sup>۳</sup>، پیشنهاد می‌کند که بزرگسالان روزانه ۲۰-۳۵ گرم فیبر رژیمی مصرف کنند زیرا تأثیر سلامت بخشی فیبرهای غذایی در انسان‌ها، اثبات شده است (جبل‌جوان و همکاران، ۱۳۹۳). وجود این ترکیبات در مواد خوراکی با افزایش در حجم مواد مصرفی، خروج آن‌ها را از دستگاه گوارش آسان می‌کند در غیر این صورت حضور بیش از حد مواد خوراکی در دستگاه گوارش (به صورت تجزیه شده یا تجزیه نشده) با ایجاد نارسایی و اختلال در کار روده، خطر ابتلا به سرطان روده را افزایش می‌دهد. به علاوه فیبرهای غذایی با اتصال به اسیدهای صفراوی، مانع جذب مجدد آن‌ها می‌شود و در نتیجه میزان کلسترول خون کاهش می‌یابد (فاطمی، ۱۳۸۶). نشاسته و گلیکوژن نیز از دیگر پلی‌ساکاریدها هستند که نقش تغذیه‌ای در بدن

<sup>۱</sup> Bemiller

<sup>۲</sup> Water holding capacity

<sup>۳</sup> United states national academy sciences

دارند. بخش اعظم کربوهیدرات‌های قابل هضم رژیم غذایی انسان‌ها را محصولات نشاسته و نشاسته هیدرولیز شده تشکیل می‌دهد. از نشاسته برای تهیه محصولات نانویی و غلات صبحانه استفاده می‌شود و علاوه بر این، می‌تواند از طریق مصرف میوه‌ها و سبزیجات در بدن تأمین گردد (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸). گلیکوژن، پلی‌ساکارید دیگری است که به صورت اندوخته انرژی شیمیایی (بطور اختصاصی در کبد و ماهیچه‌های استخوانی) حیوانات وجود دارد. از گلیکوژن کبد برای حفظ سطح گلوکز خون در بدن استفاده می‌شود. گلیکوژن ماهیچه‌های استخوانی، ماهیچه قلب و مغز به عنوان منبع گلوکز برای عملکرد فیزیولوژیکی این بافت‌ها عمل می‌کند. معمولاً در روز، ۱۰۰ گرم گلوکز مغز از گلیکوژن بدست می‌آید (تسای<sup>۱</sup>، ۲۰۰۷). از صمغ‌ها نیز به صورت تجاری در صنعت غذا و دیگر صنایع به عنوان پایدارکننده، غلیظ‌کننده، عامل ژله‌کننده، بازدارنده کریستالیزاسیون و عامل ان-کپسوله کردن و غیره استفاده می‌شود (کویی<sup>۲</sup>، ۲۰۰۵). در جدول ۱-۱ درصد کربوهیدرات برخی از مواد غذایی نشان داده شده است.

### ۱-۱-۲- نام‌گذاری کربوهیدرات‌ها

برای نام‌گذاری کربوهیدرات‌ها از نمادها و علامت‌های اختصاری زیر استفاده می‌شود.

الف) نام عمومی قندها گلیکوز<sup>۳</sup> است. قندها بر اساس تعداد اتم‌های کربن موجود در مولکولشان نام‌گذاری می‌شوند مانند تریوزها (سه کربن)، تتروزها (چهار کربن)، پنتوزها (پنج کربن)، هگزوزها (شش کربن)، هپتوزها (هفت کربن) و غیره (جبلی‌جوان و همکاران، ۱۳۹۳).

ب) برای نام‌گذاری گلیکوزیل‌ها، تنها سه حرف ابتدای نام واحدهای گلیکوزیل را بیان می‌کنند؛ بطوریکه حرف اول بصورت بزرگ نوشته می‌شود. به استثنای گلوکز که بصورت (Glc) شناخته شده است.

---

<sup>۱</sup> Tsai  
<sup>۲</sup> Cui  
<sup>۳</sup> Glycose

ج) قندها با توجه به موقعیت گروه هیدروکسیل دورترین کربن نامتقارن نسبت به عامل کربونیل به دو صورت D<sup>۱</sup> (گروه هیدروکسیل در سمت راست) و L<sup>۲</sup> (گروه هیدروکسیل در سمت چپ) تقسیم‌بندی می‌شوند. قندها در طبیعت بیشتر به فرم D هستند. قندهای نوع L نیز نقش بیوشیمیایی مهمی در مواد غذایی دارند برای مثال ال-آرابینوز و ال-گالاکتوز واحدهای سازنده برخی از پلی‌ساکاریدها هستند (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸) (پیوست ۱).

جدول ۱-۱: درصد کربوهیدرات مواد غذایی مختلف (فاطمی، ۱۳۸۶).

کربوهیدرات (%)	ماده غذایی	کربوهیدرات (%)	ماده غذایی
۳	کاهو	۷۰	گندم
۱۶	نخود سبز	۷۵	آرد گندم
۷	لوبیای سبز	۷۹	برنج (پوست‌گیری شده)
۱۴	سیب	۷۱	ذرت
۹	پرتقال	۸۷	نشاسته ذرت
۲۰	موز	۱۷	سیب‌زمینی
۷۴	خرما (خشک شده)	۲۶	سیب‌زمینی شیرین
۷۶	عسل	۳۷	کاساوا
۰/۵	گوشت	۶۰	نخود
۴	جگر	۵۸	عدس و لوبیا
۴/۸	شیر	۳۰	لوبیای سویا
۰/۵	تخم‌مرغ	۱۳	گردو

د) یک روش سیستماتیک برای نام‌گذاری قندها وجود دارد که بر اساس آن، پسوند هگزوز برای نشان دادن قند شش کربنه آلدوزی و پسوند پنتوز برای نشان دادن قند پنج کربنه آلدوزی استفاده می‌شود (جیلی‌جوان و همکاران، ۱۳۹۳) (جدول ۱-۲).

<sup>۱</sup> Dextra

<sup>۲</sup> Levo

جدول ۱-۲: نام‌های رایج و سیستماتیک برخی از قندها (رولستاد<sup>۱</sup>، ۲۰۱۲).

نام عمومی	نام علمی*
D-Erythrose	D- <i>erythro</i> -tetrose
D-Threose	D- <i>threo</i> -tetrose
D-Arabinose	D- <i>arabino</i> -pentose
D-Lyxose	D- <i>lyxo</i> -pentose
D-Ribose	D- <i>ribo</i> - pentose
D-Xylose	D- <i>xylo</i> - pentose
D-Allose	D- <i>allo</i> - hexose
D-Altrose	D- <i>altro</i> - hexose
D-Galactose	D- <i>galacto</i> - hexose
D-Glucose	D- <i>gluco</i> - hexose
D-Gulose	D- <i>gulo</i> - hexose
D-Idose	D- <i>ido</i> - hexose
D-Mannose	D- <i>manno</i> - hexose
D-Talose	D- <i>talo</i> - hexose

\* در نام‌گذاری علمی، پیشوند ساختمانی هر قند با کلمات ایتالیکی نوشته شده و نام بعد از کلمات ایتالیکی، نشان‌دهنده تعداد کربن در هر مولکول است.

ه) به ساختار حلقه‌ای پنج ضلعی و شش ضلعی، به ترتیب فورانوز<sup>۲</sup> و پیرانوز<sup>۳</sup> گفته می‌شود. این حلقه‌ها به علت وجود اتم اکسیژن، هتروسیکلیک هستند (قنبرزاده، ۱۳۸۶) (شکل ۱-۱).

و) مونوساکاریدها به دو شکل آنومری وجود دارند که توسط پیشوندهای یونانی آلفا ( $\alpha$ ) یا بتا ( $\beta$ ) نمایش داده می‌شوند. در آنومر  $\alpha$  گروه هیدروکسیل کربن شماره یک به صورت محوری (پایین/راست) و در آنومر  $\beta$  به شکل استوایی (بالا/چپ) قرار می‌گیرد (سانگ<sup>۴</sup> و همکاران، ۲۰۱۲؛ قنبرزاده، ۱۳۸۶).

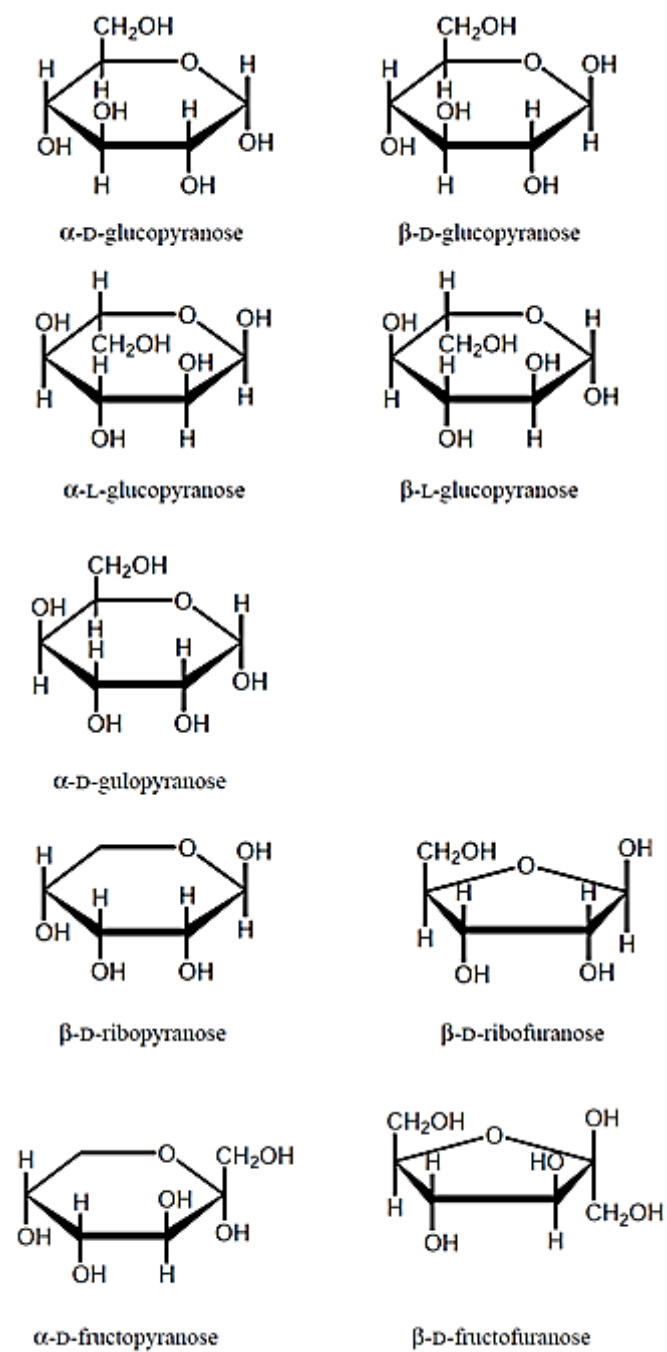
ز) برای مشخص کردن مکان پیوند در چند قندی‌ها، ابتدا شماره کربن‌های درگیر در پیوند و سپس مخفف نام معمول بیوشیمیایی آن‌ها بیان می‌شود. برای مثال پیوند بین کربن شماره ۱ و کربن شماره ۳، به صورت ۱→۳ یا ۱ و ۳ به همراه ذکر مخفف نام مونوساکاریدها عنوان می‌شود (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸).

<sup>۱</sup> Wrolstad

<sup>۲</sup> Furanose

<sup>۳</sup> Pyranose

<sup>۴</sup> Song



شکل ۱-۱: اشکال مونوساکاریدها بر اساس طرح حلقوی هاورث<sup>۱</sup> (استیک<sup>۲</sup>، ۲۰۰۱).

ساختمان کربوهیدرات‌های خوراکی به همراه موقعیت گروه هیدروکسیل خارج از حلقه‌های فورانوز و پیرانوز در پیوست ۲ آمده است.

<sup>۱</sup> Haworth

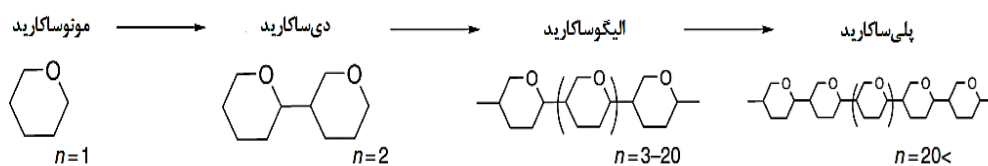
<sup>۲</sup> Stick



## ۱-۳-۱- پلی ساکاریدها

### ۱-۳-۱-۱- تعریف

پلی ساکاریدها گروه شگفت‌انگیزی از پلیمرهای زیستی (متشکل از مونوساکاریدها با اتصالات گلیکوزیدی) به شکل خطی یا منشعب هستند که در گیاهان وظیفه ذخیره انرژی، ایجاد استحکام و ترمیم را بر عهده دارند و در مصرف‌کنندگان سبب درمان بیماری‌ها می‌شوند. پلی ساکاریدها حاوی بیش از ۲۰ واحد مونومری هستند (شکل ۱-۲) و بالغ بر ۹۰٪ از کربوهیدرات‌های موجود در طبیعت را تشکیل می‌دهند (استیک، ۲۰۰۱؛ بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸). در این ترکیبات، واحدهای مونوساکارید به صورت تصادفی به یکدیگر متصل نشده‌اند، بلکه از الگوی معینی پیروی می‌کنند. معمولاً توالی مونومری در ساختار پلی ساکاریدها به طور منظم تکرار شده است و از این رو به واحدهای تکرارشونده معروف شده‌اند (لیندهورست<sup>۱</sup>، ۲۰۰۳) (شکل ۱-۳).



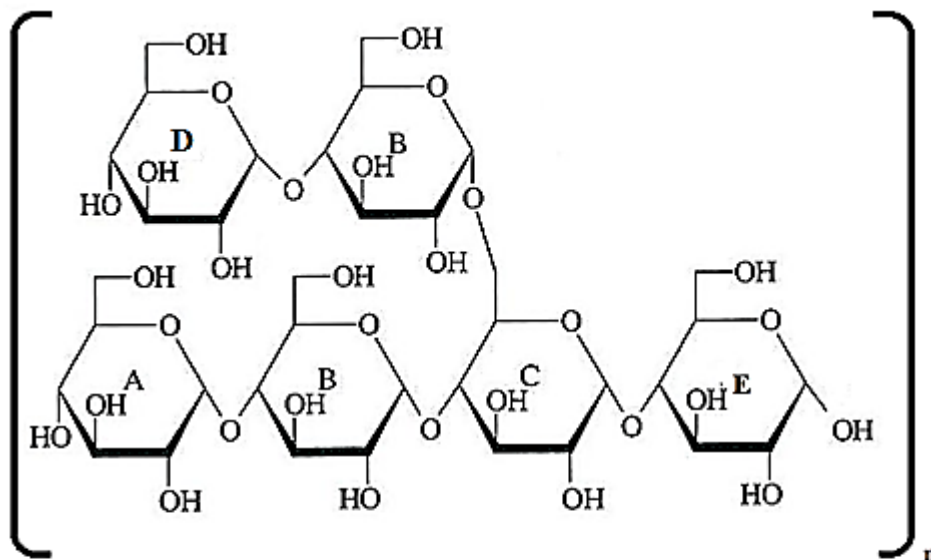
شکل ۱-۲: تعداد مونومرها در ساختار الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها و تفاوتشان با سایر کربوهیدرات‌ها (سنگ و همکاران، ۲۰۱۲).

اکثر پلی ساکاریدهای مهم، از مونوساکاریدهایی با شش اتم کربن ساخته شده‌اند و فرمول پیشنهادی برای آن‌ها  $(C_6H_{10}O_5)_n$  است. مقدار  $n$  متغیر است ولی در اغلب موارد عدد بزرگی است (زندى، ۱۳۷۵). پلی ساکاریدها مانند بسیاری از پلیمرها، وزن مولکولی مشخصی ندارند و میانگین وزن مولکولی آن‌ها را بر اساس تعداد واحدهای مونومر و درجه پلیمریزاسیون ( $DP^2$ )، مشخص می‌کنند. پلی ساکاریدها اغلب وزن مولکولی نسبتاً زیادی دارند (۱۶/۰۰۰ تا ۱۶/۰۰۰/۰۰۰ دالتون) و تفاوت آن‌ها با قندهای کوچکتر در قابلیت تبلور، حلالیت در آب و طعم و مزه است.

<sup>۱</sup> Lindhorst

<sup>۲</sup> Degree of polymerization

تعداد واحدهای مونوساکارید در ساختار پلی ساکاریدها، به درجه پلیمریزاسیون و تنوع آن‌ها بستگی دارد. تعداد کمی از پلی ساکاریدها درجه پلیمریزاسیون کمتر از ۱۰۰ دارند درحالیکه درجه پلیمریزاسیون اکثر پلی ساکاریدها بین ۲۰۰ تا ۳۰۰۰، حتی در درشت مولکول‌هایی مانند سلولز حدود ۷۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰، است (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸؛ لیندهورست، ۲۰۰۳). پلی ساکاریدها با درجه پلیمریزاسیون کم، محلول‌تر و فعال‌تر از پلی ساکاریدها با درجه پلیمریزاسیون زیاد هستند. از پلی ساکاریدها با درجه پلیمریزاسیون زیاد برای ایجاد دیسپرسیون‌هایی<sup>۱</sup> با ویسکوزیته بیشتر از آب استفاده می‌شود (والتر<sup>۲</sup> و همکاران، ۱۹۹۸).



انتهای غیر احیاکننده (A) و D

واحدهای سازنده (B)

محل اتصال شاخه (C)

انتهای احیاکننده (E)

واحد تکرارشونده (n)

شکل ۱-۳: ساختار یک پلی ساکارید منشعب متشکل از واحدهای گلوکز با اتصال (۴→۱)  $\alpha$  در زنجیر اصلی و (۶→۱)  $\alpha$  در محل انشعاب (کولینس<sup>۳</sup> و همکاران، ۱۹۹۸).

<sup>۱</sup> Dispersion

<sup>۲</sup> Walter

<sup>۳</sup> Collins

## ۱-۳-۲- انواع پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدها یا گلیکان‌ها<sup>۱</sup> را می‌توان بر اساس تفاوت در اندازه حلقه، موقعیت آنومری، نوع پیوند و خطی یا منشعب بودن ساختار از یکدیگر متمایز کرد (آسپینال<sup>۲</sup>، ۱۹۸۴). لذا روش‌های متفاوتی برای طبقه‌بندی پلی ساکاریدها وجود دارد. در یک روش کلی می‌توان آن‌ها را به دو دسته هموپلی ساکارید<sup>۳</sup> و هتروپلی ساکارید<sup>۴</sup> تقسیم‌بندی کرد.

هموپلی ساکاریدها یک نوع مونومر در ساختار خود دارند و بسته به اینکه مونومر سازنده آن‌ها از چه نوعی باشد به دسته‌های مختلفی مانند گلوکان<sup>۵</sup>، مانان<sup>۶</sup>، گالاکتان<sup>۷</sup>، آرابان<sup>۸</sup> و غیره تقسیم‌بندی می‌شوند (صمصام‌شریعت، ۱۳۸۳). هموپلی ساکاریدها، هموگلیکان نیز نامیده می‌شوند برای مثال سلولز و آمیلوز هموگلیکان خطی و آمیلوپکتین هموگلیکان شاخه‌دار است که از واحدهای گلوکوپیرانوز تشکیل شده‌اند (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸).

هتروپلی ساکاریدها بیش از یک نوع مونومر در ساختار خود دارند مانند مانوگالاکتان<sup>۹</sup>، زیلوگلوکان<sup>۱۰</sup> و غیره (صمصام‌شریعت، ۱۳۸۳). پلی ساکاریدی که حاوی دو نوع مونوساکارید باشد، دی‌هتروگلیکان و پلی ساکاریدی که حاوی سه نوع مونوساکارید باشد، تری‌هتروگلیکان نامیده می‌شود. دی‌هتروگلیکان‌ها پلیمرهای خطی هستند که عموماً واحدها به صورت متناوب در میان زنجیر قرار دارند و یا زنجیر اصلی از یک گلیکوزیل تشکیل شده و دارای شاخه<sup>۱۱</sup> یک واحدی از مونوساکارید دیگر است. برای مثال آلژین<sup>۱۱</sup> یک دی‌هتروگلیکان خطی است و گوار<sup>۱۲</sup> و صمغ لوبیای خرنوب<sup>۱۳</sup> از پلی ساکاریدهای

---

<sup>۱</sup> Glycan

<sup>۲</sup> Aspinall

<sup>۳</sup> Homo polysaccharide

<sup>۴</sup> Hetro polysaccharide

<sup>۵</sup> Glucan

<sup>۶</sup> Mannan

<sup>۷</sup> Galactan

<sup>۸</sup> Araban

<sup>۹</sup> Mannogalactan

<sup>۱۰</sup> Xyloglucan

<sup>۱۱</sup> Algins

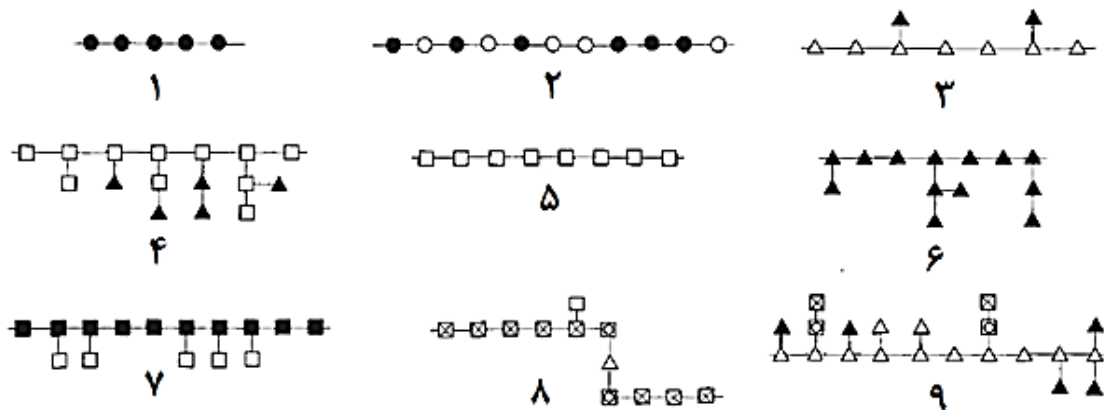
<sup>۱۲</sup> Guar

<sup>۱۳</sup> Locust bean gum

شاخه‌دار هستند (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸). تفاوت در بسیاری از هتروپلی ساکاریدها، به علت تفاوت در زنجیر جانبی به صورت هترو یا هموگلیکان است (پیوست ۳ و ۴) (آسپینال، ۱۹۸۴). گاهی پلی ساکاریدها حاوی مقدار قابل توجهی پروتئین و قندهای آمینه (حاوی گروه‌های آمین) هستند که گلیکوز-آمینوگلیکان<sup>۱</sup> نامیده می‌شوند و یا به شکل گلیکوپلیمر، گلیکوپروتئین<sup>۲</sup>، گلیکولیپید<sup>۳</sup>، پروتئوگلیکان<sup>۴</sup> و دیگر گلیکوهی مزوج در طبیعت وجود دارند (سانگ و همکاران، ۲۰۱۲؛ لیندهورست، ۲۰۰۳).

### ۱-۳-۳- انواع اتصالات مونومری در پلی ساکاریدها

ترتیب و توالی مونوساکاریدها در پلی ساکاریدهای رژیمی (فیبرها) متفاوت است لذا ساختار و ویژگی‌های متفاوتی محتمل است. در شکل ۱-۴ چند نوع از توالی‌های مختلف نشان داده شده است.



علامت‌ها: ●: گلوکز ۴ → ۱، ○: گلوکز ۳ → ۱، ▲: آرابینوز، △: زایلوز، □: گالاکتوز، ■: مانوز،  
 ☒: اسید گالاکتورونیک، □: رامنوز.

۱: سلولز، ۲: بتا-گلوکان ناهمگن، ۳: آرابینوزیلان، ۴: آرابینوگالاکتان، ۵: گالاکتان، ۶: آرابینان،

۷: گالاکتومانان، ۸: رامنوگالاکتورونان (پکتین)، ۹: پلی ساکارید در ایسپاگولا<sup>۵</sup>.

شکل ۱-۴: بخشی از ساختارهای فرضی فیبرهای رژیمی (آسپ<sup>۶</sup>، ۱۹۸۷).

<sup>۱</sup> Glycos amino glycans (GAGs)

<sup>۲</sup> Glycoprotein

<sup>۳</sup> Glycolipid

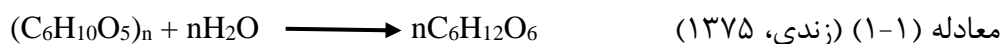
<sup>۴</sup> Proteoglycan

<sup>۵</sup> Ispaghula

<sup>۶</sup> Asp

اغلب پلی‌ساکاریدهای حاوی واحدهای گلیکوزیل، به طور متوسط سه گروه هیدروکسیل دارند. هر کدام از گروه‌های هیدروکسیل می‌تواند با اتم هیدروژن موجود در یک تا تعداد بیشتری از مولکول‌های آب پیوند برقرار کند. همچنین، اکسیژن در حلقه گلیکوزیدی نیز می‌تواند با هیدروژن مولکول آب ایجاد پیوند کند. بنابراین هر واحد قند در زنجیر پلی‌ساکارید، ظرفیت نگهداری مولکول آب را داراست. از این‌رو، زمانیکه آب در دسترس باشد، گلیکان‌ها سبب اتصال محکم بین آب و دیگر هیدرات‌ها می‌شوند (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸). اتصال بین یک مولکول مونوساکارید با مولکول بعدی سبب جدا شدن یک مولکول آب از ساختار می‌شود. هیدرولیز ناقص، منجر به تجزیه مولکولی پلی‌ساکاریدها به قسمت‌های کوچکتر که حاوی تعداد متفاوتی از واحدهای مونوساکاریدی است، می‌شود و چنانچه هیدرولیز از شدت کافی برخوردار باشد (هیدرولیز کامل)، ممکن است پلی‌ساکارید به طور کامل به واحدهای مونوساکارید سازنده خود تبدیل شود (زندى، ۱۳۷۵).

معمولاً در سیستم‌های حاوی آب، برخی از پلی‌ساکاریدها با جذب آب و تورم به طور کامل یا ناقص تجزیه می‌شوند (معادله ۱-۱)، لذا آب نقش مهمی در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پلی‌ساکاریدها دارد و خصوصیات عملکردی غذاها مانند بافت را کنترل می‌کند.



پلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی پایین، سبب جابه‌جایی آب در سیستم‌های غذایی و اصلاح آن‌ها می‌شوند. کربوهیدرات‌های بزرگ مولکول و کوچک مولکول عموماً برای نگهداری محصولات غذایی در دمای انجماد (معمولاً  $-18^\circ C$ ) مؤثر هستند، لذا از تغییرات مخرب در بافت و ساختار مواد غذایی در دماهای مختلف، جلوگیری می‌کنند. بهبود کیفی محصولات و پایداری انبارداری آن‌ها نتیجه کنترل مقدار (برای کربوهیدرات‌های کوچک مولکول) و ساختار (به ویژه در مورد کربوهیدرات‌های پلیمری) ماتریکس آمورف<sup>۱</sup> و کنسانتره منجمد در اطراف کریستال‌های یخ است (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸).

<sup>۱</sup> Amorphous

از لحاظ قابلیت انحلال در آب پلی ساکاریدها به دو گروه محلول در آب (هیدروکلوئیدها) و نامحلول در آب طبقه بندی می شوند که در زیر به طور مختصر شرح داده شده اند.

### ۱-۱-۳-۱- پلی ساکاریدهای محلول در آب یا هیدروکلوئیدها

اکثر پلی ساکاریدهای غذایی در دسته پلی ساکاریدهای محلول در آب یا هیدروکلوئیدها قرار دارند. پلی ساکاریدهای محلول در آب به راحتی در محلول های آبی داغ و حتی سرد حل می شوند و معمولاً به طور طبیعی در مواد غذایی وجود دارند یا به سیستم های غذایی افزوده می شوند. مهم ترین ویژگی عملکردی هیدروکلوئیدها در مواد غذایی، ظرفیت نگهداری آب و افزایش ویسکوزیته است. برخی از پلی ساکاریدهای محلول در آب ایجاد ژل می کنند و برای کنترل خواص بافتی غذاهای نیمه جامد به کار می روند. خواص عملکردی پلی ساکاریدها به ساختار، وزن مولکولی و غلظت پلی ساکاریدها در ماده غذایی بستگی دارد (کویی، ۲۰۰۵).

از علل گسترش کاربرد هیدروکلوئیدها در صنعت می توان به تأثیر آن ها در غلظت های بسیار کم (حتی کمتر از ۱٪) و ایجاد بافت و خواص حسی مناسب اشاره کرد. برای مثال با استفاده از هیدروکلوئیدها می توان سس های سالاد بدون روغن و مناسب تر از نظر تغذیه ای تولید کرد (ویلیامز<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۰). انتخاب نوع هیدروکلوئید به خصوصیات مورد نیاز در هر محصول، ویژگی های ماده غذایی از نظر pH، حضور نمک ها و فلزات، درجه حرارت، قیمت هیدروکلوئید و مقدار و نحوه دسترسی به آن ها بستگی دارد. در جدول ۱-۳ مهم ترین هیدروکلوئیدهای تجاری و منابع آن ها عنوان شده است.

هیدروکلوئیدها به عنوان عوامل ایجادکننده قوام در صنعت مواد غذایی کاربردهای زیادی دارند و با کاربردی شدن رئومترها (با قابلیت کنترل تنش برشی و سرعت برشی) در سی سال اخیر پیشرفت های علمی قابل توجهی در فهم بهتر و بیشتر این سیستم ها صورت گرفته است (فرحناکی و همکاران، ۱۳۹۲). مقدار و هزینه واردات برخی از هیدروکلوئیدهای مهم خوراکی در سال ۱۳۹۴ به ایران در جدول ۱-۴ آمده است.

<sup>۱</sup> Williams

جدول ۱-۳: منابع تولید هیدروکلوئیدهای مهم تجاری (فرحناکی و همکاران، ۱۳۹۲).

نوع	منبع	مثال
گیاهی	درخت	سلولز
	ماده مترشحه درختان	صمغ عربی، صمغ کارابا، صمغ گاتی و کتیرا
	قسمت‌های مختلف گیاهان	نشاسته، پکتین و سلولز
	دانه‌ها	صمغ گوار، صمغ دانه‌خرنوب و صمغ تارا
جلبک‌ها	غده‌ها	صمغ کونجاک مانان
	جلبک قرمز دریایی جلبک قهوه‌ای دریایی	صمغ آگار و صمغ کاراجینان صمغ آلژینات
میکروبی	میکروب‌ها	زانتان، کوردلان، دکستران، ژلان
حیوانی	اندام‌های حاوی کلاژن	ژلاتین
	شیر گاو پوست میگو و منابع مشابه	کازئینات و پروتئین آب‌پنیر کیتوزان

جدول ۱-۴: مقدار و هزینه هیدروکلوئیدهای مهم خوراکی وارداتی در سال ۱۳۹۴ (مأخذ: اتاق بازرگانی، صنایع، معادن و کشاورزی تهران<sup>۱</sup>).

ردیف	محصول	وزن (کیلوگرم)	ارزش (دلار)
۱	صمغ عربی طبیعی	۲۷۱/۶۱	۶۳۵/۲۶۸
۲	آگار	۸۷۱/۶۳	۹۹۲/۳۲۱
۳	دانه‌خرنوب، مواد غلیظ‌کننده مشتق شده از دانه‌خرنوب، دانه گوار	۳۴۹/۶	۹۸۷/۹۶۰
۴	مواد پکتینی، پکتینات‌ها و پکتات‌ها	۱۲۹/۲۴	۱/۷۲۶/۱۸۱
۵	کربوکسی‌متیل سلولز و املاح خوراکی	۷۸۷/۱۵	۲/۵۴۵/۳۴۷

لذا با افزایش وابستگی به مواد غذایی آماده در سراسر جهان (به خصوص در شمال آمریکا، اروپا، مناطق آسیا و اقیانوس آرام)، تقاضای جهانی هیدروکلوئیدها، بطور قابل توجهی افزایش یافت به گونه‌ای که

<sup>۱</sup> www.tccim.ir

در سال ۲۰۱۵، فروش برخی از هیدروکلونیدهای مهم گیاهی، میکروبی، جلبک دریایی و حیوانی بیش از ۶/۶ میلیارد دلار بوده است و باید تا سال ۲۰۲۰ با نرخ رشد ۴/۴٪ به ۸/۲ میلیارد دلار برسد<sup>۱</sup>.

### ۱-۳-۲- پلی ساکاریدهای نامحلول در آب

ساختار پلی ساکاریدها ممکن است بسیار شاخه دار، چند شاخه، مارپیچی شکل و خطی باشد و هر کدام از این ساختارها می تواند بر حلالیت پلی ساکاریدها تأثیر بگذارد. برای مثال در هموگلیکان های خطی، هیدروژن متصل با هریک از کریستال ها به صورت آمورف جدا می شود؛ بدین ترتیب ناحیه کریستالی پلی ساکاریدها از دسترس آنزیم ها دور می شود. این نوع پلی ساکاریدها، محکم، نامحلول و در برابر تجزیه مولکولی مقاومند و علی رغم شفافیت، برای هیدراته شدن و انحلال در آب مناسب نیستند. سلولز با ساختاری مسطح و نوار مانند چنین رفتاری دارد و مثال مناسبی از این دست است. از طرف دیگر، اکثر پلی ساکاریدهای منشعب به شکل میسل درمی آیند زیرا شاخه های جانبی آنها از بسته شدن زنجیر اصلی در طول مولکول جلوگیری می کنند و منجر به ایجاد تعداد قابل ملاحظه ای پیوند درون مولکولی به شکل کریستالیت می شوند (بمیلر و همکاران، ۲۰۰۸).

### ۱-۴- اهمیت و کارایی پلی ساکاریدها در صنایع غذایی

با وجود منابع فراوان نشاسته و سلولز در طبیعت، سایر پلی ساکاریدها (با وجود اهمیت و کاربردهای در صنایع غذایی) از منابع محدودتری برخوردارند.

از مهم ترین موارد کاربرد پلی ساکاریدها در تهیه و تولید مواد غذایی می توان به مواردی نظیر ظرفیت اتصال به آب، ویژگی های رئولوژیکی، توانایی تشکیل فیلم و ژل، توانایی محبوس ساختن ترکیبات عطری، ایجاد فشار اسمزی، واکنش پذیری شیمیایی، جذب مجدد، افزایش طعم و شیرین کردن اشاره کرد (جهان بین، ۱۳۹۰).

---

<sup>۱</sup> www.bccresearch.com



با توجه به اهمیت و گسترده بودن خواص عملکردی پلی ساکاریدها، یافتن منابع جدیدی از پلی ساکاریدها با قابلیت استفاده در صنعت و بررسی و شناسایی ساختار آن‌ها در صنعت مواد غذایی حائز اهمیت است.

## ۱-۲- استخراج پلی ساکاریدها

فرآیند استخراج شامل جداسازی بخشی از گیاه با خواص دارویی، کارکردی یا تغذیه‌ای و یا بخشی از ترکیبات غیرفعال یا درونی بافت‌های حیوانی است که توسط حلال‌های گوناگون و با روش‌های استاندارد انجام می‌شود. محصولاتی که معمولاً از گیاهان بدست می‌آیند مایعات ناخالص، نیمه جامد یا پودری هستند که استعمال خارجی یا مصرف دهانی دارند. روش‌های استخراج در گذشته شامل جوشاندن، دم کردن، استخراج مایعات، استخراج نیمه جامدها و پودرها بود. محققان به افتخار جالینوس (پزشک یونانی قرن دوم) روش‌های آماده‌سازی برای استخراج را به نام روش جالینوسی نام‌گذاری کرده‌اند. استخراج ترکیبات گیاهی شامل مراحل زیر است (هندا<sup>۱</sup>، ۲۰۰۸):

۱- کاهش اندازه اندام‌های گیاه

۲- استخراج توسط حلال

۳- صاف کردن

۴- تغلیظ نمونه

۵- خشک کردن نمونه

## ۱-۱-۲- کاهش اندازه اندام‌های گیاه

هدف از این مرحله، جدا کردن اندام‌ها، بافت‌ها و سلول‌های ساختاری اجزای گیاهان است تا ترکیبات به میزان بیشتری در معرض حلال مورد استفاده برای استخراج قرار گیرند. لذا هدف اصلی از مرحله کاهش اندازه، افزایش سطح تماس و در نتیجه افزایش تبادل مواد مورد نیاز با حلال استخراج است (هندا، ۲۰۰۸). در مواردی که نمونه‌ها، ناهمگن هستند یا اندازه مناسبی ندارند برای سهولت کار باید

---

<sup>۱</sup> Handa

آسیاب شوند. معمولاً نمونه‌ها را طوری آسیاب می‌کنند که از الک با مش ۳۵ بگذرند و برای این کار از وسایل گوناگونی مانند آسیاب، هاون، مخلوط‌کن، همزن‌های مکانیکی و غیره استفاده می‌شود (حسینی، ۱۳۸۴).

#### ۱-۲-۱-۲- استخراج توسط حلال

در استخراج جامد-مایع، زمانیکه مواد جامد در مجاورت با حلال قرار می‌گیرند، ترکیبات آن‌ها به حلال منتقل می‌شود بنابراین، استخراج بر اساس انتقال مواد جامد محلول به حلال صورت می‌گیرد. در این زمان، محلول غلیظ‌تر می‌شود و سرعت انتقال مواد کاهش می‌یابد، لذا باید برای کاهش غلظت محلول و افزایش راندمان استخراج، حلال تازه اضافه شود (هندا، ۲۰۰۸).

قندها مانند سایر ترکیبات از قانون عمومی انحلال-انحلال یک ماده در ماده‌ای مشابه با آن تبعیت می‌کنند. از این‌رو قندها به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، در آب و الکل بسیار محلولند اما در حلال‌های غیرقطبی حلالیت کمی دارند (جیلی جوان و همکاران، ۱۳۹۳). انتقال ترکیبات از مواد جامد به داخل حلال به قابلیت حل‌کنندگی حلال، نوع حلال و دمای حلال بستگی دارد. ویژگی‌های ذکر شده سبب ایجاد روش‌های مختلف استخراج (مانند استخراج سرد، استخراج گرم و غیره) می‌شود. انتخاب حلال به قابلیت حل‌پذیری ترکیبات گیاهی بستگی دارد و روش استخراج با در نظر گرفتن نوع حلال تعیین می‌شود. برای مثال در صورتیکه نیاز به حلال در حال جوش خالص یا همجوش باشد از روش استخراج مداوم استفاده می‌شود. از نکات مهم در انتخاب نوع حلال، نقطه جوش آن است و برای حفظ اجزاء اصلی و ناپایدار در برابر دما، بهتر است حلال در فشار پایین‌تر از فشار اتمسفر مورد استفاده قرار گیرد (هندا، ۲۰۰۸).

#### ۱-۲-۱-۳- صاف کردن

محلول حاصل از استخراج اجزای گیاه، در قیف‌هایی که با کاغذ صافی پوشانده شده‌اند، صاف می‌شود و بدین ترتیب اجزای نامحلول گیاهی در قیف باقی می‌مانند و عصاره وارد ظرف نگهداری می‌شود. در برخی موارد لازم است عصاره از ظرف نگهداری به صافی‌های دیگر پمپ شود تا ذرات و کلوئیدها جدا

شوند (هندا، ۲۰۰۸). برای جداسازی قندها از محلول استخراجی، در اکثر موارد از روش استخراج با الکل استفاده می‌شود و پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدهای بزرگتر که در اتانل ۸۰٪ نامحلولند با کمک صاف کردن یا سانتریفیوژ از محلول جدا می‌شوند (جبل‌جوان و همکاران، ۱۳۹۳).

#### ۱-۲-۱-۴- تغلیظ نمونه

محلول غنی از مواد استخراج شده به دستگاه تغلیظ انتقال داده می‌شود و با ایجاد خلاء و تبخیر حلال، محلول تغلیظ می‌شود. در این فرآیند، محلول غلیظ شده حاصل می‌شود و حلال در ظرف دیگر جمع آوری می‌گردد. لذا، از این حلال می‌توان مجدداً استفاده کرد. محلول تغلیظ شده برای مراحل بعدی آزمایش می‌تواند به صورت محلول و یا خشک شده مورد استفاده قرار گیرد (هندا، ۲۰۰۸).

#### ۱-۲-۱-۵- خشک کردن نمونه

به منظور جلوگیری از فساد، کاهش حجم، سادگی حمل‌ونقل و نگهداری ماده حاصله با حداقل امکانات، از روش‌های مختلفی برای خشک کردن نمونه‌های حاصل از فرآیند استخراج استفاده می‌شود که می‌توان به خشک کردن انجمادی<sup>۱</sup>، خشک کردن پاششی<sup>۲</sup>، خشک کردن درون آون<sup>۳</sup> معمولی و آون تحت خلاء<sup>۴</sup> و یا خشک کردن در زیر هود اشاره کرد. مقایسه نتایج تحقیقات چاپ شده نشان می‌دهد که فرآیند خشک کردن بر روی ساختار مولکولی و شیمیایی پلی‌ساکاریدها تاثیرگذار است و کمترین آسیب با استفاده از روش خشک کردن انجمادی حاصل می‌شود (فرجی، ۱۳۸۶؛ میرحسینی و همکاران، ۲۰۱۳).

#### ۱-۲-۲- روش‌های استخراج پلی‌ساکاریدها

روش استخراج پلی‌ساکاریدها بر اساس ویژگی‌های منحصربفرد پلی‌ساکاریدهای طبیعی و سنتزی تعیین می‌شود. برخی از پلی‌ساکاریدها صرفاً در آب داغ، برخی دیگر در آب سرد و تعدادی در هر دو حل می‌شوند. همچنین، برای استخراج برخی از پلی‌ساکاریدها به حلال‌های آبی اسیدی، بازی یا

<sup>۱</sup> Freeze dryer (FD)

<sup>۲</sup> Spray-dryer

<sup>۳</sup> Oven-dryer

<sup>۴</sup> Vacuum oven dryer

ترکیبات شلات‌کننده<sup>۱</sup> نیاز است (کیان<sup>۲</sup>، ۲۰۱۰). تجزیه کمی پلی‌ساکاریدهای دانه‌های کامل، مغزها یا بقولات که حاوی سیستم‌های پیچیده و مرکب از چربی، پروتئین و دیگر مواد کربوهیدراتی هستند، مشکل است و نیاز به استفاده ترکیبی از چندین مرحله برای حذف مواد خارجی، چربی‌ها، پروتئین‌ها و سایر کربوهیدرات‌های موجود در نمونه دارد (برومر<sup>۳</sup> و همکاران، ۲۰۰۶). اغلب پروتئین‌های سیتوپلاسمی (پروتئین‌های موجود در غشاهای، آنزیم‌ها و غیره) اسیدهای نوکلئیک و پلی‌ساکاریدهای ذخیره‌ای مانند نشاسته با افزودن ترکیباتی با وزن مولکولی کم مانند پلی‌فنول‌ها و استرهای فسفات به ترکیبات باقی‌مانده ته‌نشین می‌شوند. چگونگی جذب پروتئین‌های محلول توسط دیواره سلولی شکسته شده و نیز فاکتورهایی که بر عمل پلی‌فنول‌ها و محصولات حاصل از اکسیداسیون آن‌ها بر روی پروتئین‌ها اثر گذارند، توسط نیوکامب<sup>۴</sup> توضیح داده شده است (نیوکامب، ۱۹۶۳).

مراحل مورد نیاز در استخراج پلی‌ساکاریدها به میزان ترکیبات نمونه و نوع پلی‌ساکاریدی که استخراج می‌شود بستگی دارد. در ادامه عمومی‌ترین روش مورد استفاده در استخراج پلی‌ساکاریدها همراه با مهم‌ترین عواملی که باید در نظر گرفته شوند آورده شده است.

اولین عامل، ماده اولیه و ویژگی‌های آن است. برای استخراج پلی‌ساکاریدها، نمونه خشک شده ایده‌آل است لذا باید نمونه مرطوب به روش انجمادی و یا در آن خشک شود. برای نمونه‌های حاوی چربی‌ها و مواد غیرقطبی، استخراج با کمک مخلوط کلروفرم-متانل ۵:۹۵ توسط دستگاه سوکسله انجام می‌شود تا نمونه فاقد چربی شود. از حلال هگزان نیز می‌توان استفاده کرد و ارجحیت آن بر کلروفرم، ایمنی بیشتر این حلال است. پس از این مرحله نمونه فاقد چربی، خشک می‌شود و سپس تحت تیمار با اتانل ۸۰٪ داغ قرار می‌گیرد تا مولکول‌های قندی کم وزن، مواد معدنی، رنگ‌ها، اسیدهای آلی، اسیدآمین‌های آزاد و پپتیدهای کم وزن حذف شوند. استخراج با اتانل ۸۰٪ همچنین باعث غیر فعال کردن آنزیم‌های موجود در نمونه می‌شود (برومر و همکاران، ۲۰۰۶).

---

<sup>۱</sup> Chelating agent

<sup>۲</sup> Qian

<sup>۳</sup> Brummer

<sup>۴</sup> Newcomb

## ۱-۲-۲-۱- حلال پلی ساکاریدها

حلال‌های مختلفی برای استخراج پلی ساکاریدها وجود دارد اما آب با دماهای مختلف معمولاً اولین انتخاب برای استخراج پلی ساکاریدهای طبیعی است. قابلیت استخراج پلی ساکاریدها در اغلب موارد با افزایش دمای حلال آبی، افزایش می‌یابد. امروزه دی‌متیل سولفاکسید<sup>۱</sup> (معمولاً با ۱۰٪ آب) جایگزین حلال‌های قطبی و غیر آبی به منظور حل کردن گرانول‌های نشاسته و استخراج پلیمرهای ۵-استیل-۴-۱-۰-متیل گلوکورونوزیلان‌ها و ۵-۱-استیل گالاکتوگلوکومانان‌ها شده است، زیرا با استفاده از این ترکیب می‌توان این پلیمرها را به صورت کامل و بدون ایجاد شکستگی در ساختارشان استخراج نمود. استفاده از محلول‌های اسیدی برای استخراج پلی ساکاریدهای خنثی صحیح نیست، زیرا خطر هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی در ساختار پلی ساکاریدها وجود دارد. زمانیکه، اسیدهای معدنی زمان و دمای مناسبی داشته باشند می‌توانند تمام پلی ساکارید را هیدرولیز کنند با این حال، برای تهیه تجاری پکتین (از پوست مرکبات یا پالپ سیب) از محلول‌های آبی اسیدی با pH، ۱ تا ۳ در دمای ۵۰-۹۰°C کمک گرفته می‌شود. برای استخراج پلی ساکاریدهای اسیدی مانند پکتین، که دارای ترکیبات سخت و یون‌های دوظرفیتی هستند، عوامل شلات‌کننده مانند اگزالات آمونیوم<sup>۲</sup>، هگزامت-فسفات سدیم<sup>۳</sup>، اتیلن‌دی‌آمین‌تترا اسید استیک<sup>۴</sup> یا سیکلو هگزان‌دی‌آمین‌تترا اسید استیک<sup>۵</sup> استفاده می‌شود (کویی، ۲۰۰۵؛ والتر، ۱۹۹۸). کاتو<sup>۶</sup> و همکاران نیز در سال ۱۹۸۳ از کلریدروی<sup>۷</sup> برای استخراج بتا ۱ به ۳ گلوکان دارای شاخه در محل کربن شماره ۶ گلوکز از گیاه گریفولا فروندوسا<sup>۸</sup> استفاده کردند (کاتو و همکاران، ۱۹۸۳). برای استخراج زایلوگلیکان‌ها، زایلان‌ها، بتا گلوکان‌ها، پکتین‌ها و نیز پلی ساکاریدهای حاوی اسید اورونیک معمولاً از محلول رقیق هیدروکسید سدیم<sup>۹</sup>

<sup>۱</sup> Dimethyl sulfoxide (DMSO)

<sup>۲</sup> Ammonium oxalate

<sup>۳</sup> Sodium hexametaphosphate

<sup>۴</sup> Ethylen diamine tetra acetic acid (EDTA)

<sup>۵</sup> Cyclo hexane diamine tetra acetic acid (CDTA)

<sup>۶</sup> Kato

<sup>۷</sup> Zinc chloride

<sup>۸</sup> *Grifola frondosa*

<sup>۹</sup> Sodium hydroxide

استفاده می‌شود. هیدروکسیدباریم اشباع<sup>۱</sup> حلال دیگری است که بطور اختصاصی برای استخراج آرابینوزیلان‌های نامحلول در آب، گندم و جو استفاده می‌شود. به علاوه، N-متیل‌مورفولین-N-اکساید<sup>۲</sup> حلال مناسبی برای استخراج پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی مانند سلولز است. سلولز در بیشتر حلال‌ها نامحلول است اما می‌تواند در محلول آبی کلریدروی یا کادوکسین<sup>۳</sup> محلول ۵٪ (W/V)، اکسیدکادمیم<sup>۴</sup> ۲۸٪ (V/V) و اتیلن‌دی‌آمین<sup>۵</sup> در آب حل شود. محلول‌های قلیایی نیز به طور گسترده برای استخراج پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی استفاده می‌شوند (سریواستاوا<sup>۶</sup> و همکاران، ۱۹۸۹؛ کویی، ۲۰۰۵). حلال‌های قلیایی رقیق از طریق تغییر مولکول معدنی منجر به تورم ضعیفی در فیبریل‌های پلی‌ساکاریدها شده و حلال‌های قلیایی قوی منجر به ایزومریزاسیون، انولیزاسیون و هیدرولیز گلیکوپیرانوزهای مانند نشاسته می‌شوند (والتر، ۱۹۹۸). افزودن بوروهیدرات‌سدیم به محلول‌های حاصل از استخراج پلی‌ساکاریدها، معمولاً برای کاهش خطر حذف بتا<sup>۷</sup> است. این ترکیب ممکن است منجر به افزایش pH و در نتیجه ایجاد محیط قلیایی برای محلول استحصالی شود و حدس زده می‌شود که تحت شرایط قلیایی، استر و دیگر پیوندهای کووالانسی و غیرکووالانسی شکسته شوند و پلی‌ساکاریدهایی که در ابتدا غیرقابل استخراج بودند، از شبکه پیچیده دیواره سلولی رها شوند. باید به این نکته اشاره کرد که در استخراج با قلیا، پلی‌ساکاریدهایی زودتر از دیواره سلولی رها می‌شوند که محلول در آب باشند (کویی، ۲۰۰۵).

### ۱-۳- خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها

در نتیجه استفاده از روش‌های استخراج مختلف، مخلوطی از ترکیبات شامل پلی‌ساکاریدها و مواد غیر قندی حاصل می‌شود. بنابراین لازم است تا عصاره تهیه شده به کمک روش‌های مختلف تصفیه شود تا در نهایت پلی‌ساکاریدهای کاملاً خالص حاصل شوند. مواد غیر قندی مانند پروتئین‌ها اغلب توسط

---

<sup>۱</sup> Saturated barium hydroxide

<sup>۲</sup> N-methylmorpholine-N-oxide

<sup>۳</sup> Cadoxen

<sup>۴</sup> Cadmium oxide

<sup>۵</sup> Ethylenediamine

<sup>۶</sup> Srivastava

<sup>۷</sup>  $\beta$ -elimination

آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین مانند پاپائین<sup>۱</sup> یا پروتئازهای میکروبی هضم می‌شوند (بروممر و همکاران، ۲۰۰۶).

از سایر روش‌های خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها می‌توان به استفاده از نمک‌های مس<sup>۲</sup> یا اسید بوریک<sup>۳</sup> اشاره کرد (سریواستاوا و همکاران، ۱۹۸۹). نشاسته باقی‌مانده را در مرحله ترسیب پلی‌ساکاریدها با الکل می‌توان حذف کرد. این مرحله معمولاً توسط هضم نمونه‌ها با آلفا-آمیلازها یا آمیلوگلوکوزیدازها و پس از آن سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها انجام می‌شود. در نتیجه، گلوله‌هایی از مواد غیر محلول پیچیده تشکیل می‌شوند (احتمالاً سلولز یا همی‌سلولز) و مواد پلی‌ساکاریدی معلق در سطح (حاوی نشاسته هیدرولیز شده) به کمک ترسیب با اتانل یا ایزوپروپیل‌الکل<sup>۴</sup> جداسازی می‌شوند (بروممر و همکاران، ۲۰۰۶). لازم است به جداسازی پلی‌ساکاریدهای نامحلول مانند سلولز توجه شود. این پلیمرها می‌توانند از کتان خام یا چوب بدست آیند. برای این منظور باید سایر ترکیبات مواد اولیه بخوبی جداسازی شوند. برای مثال واکس‌ها و چربی‌ها می‌توانند با کمک کلروفرم، بنزن و اتانل استخراج و جدا شوند. لیگنین با تیمار کلر و اسید و همی‌سلولزها با کمک تیمارهای قلیایی حذف می‌شوند و در نتیجه، آنچه باقی می‌ماند، سلولز نامحلول است (کویی، ۲۰۰۵).

### ۱-۳-۱- هضم پروتئین‌ها

ترکیبات محلول متفاوتی در حین استخراج با آب، از اندام‌های گیاهان خارج می‌شوند که از مهمترین آن‌ها، پروتئین‌ها هستند. روش‌های مختلفی برای حذف پروتئین‌ها و خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها از این ترکیبات وجود دارد که واکنش‌های شیمیایی اساس عمل اکثر آن‌ها است. در چند سال اخیر چندین روش برای حذف پروتئین‌ها از پلی‌ساکاریدها مطرح شده که مهم‌ترین آن‌ها تیمار با کلروفرم و ۱- بوتانل یا ۱-پنتانل (روش سواگ<sup>۵</sup>) و تری‌فلوروتری‌کلرواتان<sup>۶</sup> است. آسان‌ترین روش حذف پروتئین‌ها

<sup>۱</sup> Papain

<sup>۲</sup> Copper salts

<sup>۳</sup> Boric acid

<sup>۴</sup> Isopropyl alcohol (IPA)

<sup>۵</sup> Sevag method

<sup>۶</sup> Trifluorotrichloroethane

استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند پروناز<sup>۱</sup> یا پاپائین و سپس ترسیب پلی‌ساکاریدها با چهار حجم اتانل یا ایزوپروپیل‌الکل (در استخراج با آب) است (برومر و همکاران، ۲۰۰۶).

در ادامه متداول‌ترین روش‌های حذف پروتئین‌ها از محلول‌های پلی‌ساکاریدی و برخی از خصوصیات آن‌ها ذکر شده است:

۱- روش‌های آنزیمی: در خالص‌سازی به روش آنزیمی، آنزیم باید عاری از گلیکوهیدرولازها<sup>۲</sup> باشد در غیر اینصورت پلی‌ساکارید نیز دچار تخریب ساختاری می‌شود.

۲- ترسیب به کمک اسید تری‌کلرواستیک<sup>۳</sup> یا اسید سولفوسالسیلیک<sup>۴</sup>: در این روش پروتئین‌های ترسیب شده به کمک اسید تری‌کلرواستیک یا اسید سولفوسالسیلیک هضم می‌شوند، اما خطر ته‌نشین شدن مقداری از صمغ‌ها (مانند آلژینات‌ها یا پکتین‌های کم استر) نیز وجود دارد.

۳- جذب پروتئین‌ها بر روی کلیت‌ها<sup>۵</sup>: جذب سطحی پروتئین‌ها بر روی کلیت، بستر سیلیسی و انواع خاک رس برای پروتئین‌زدایی عصاره گیاهان، یکی دیگر از این روش‌ها است.

۴- رزین‌های تبادل‌کننده کاتیونی قوی به شکل  $H^+$ : در این روش محلول استخراجی حاوی مواد گیاهی (پلی‌ساکارید و پروتئین) را از میان رزین‌های تبادل‌کننده کاتیون قوی به فرم  $H^+$  عبور می‌دهند. در این شرایط پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای اورونیک حاوی بار مثبت، با ستون پیوند برقرار می‌کنند و پلی‌ساکاریدهای خنثی براحتی خارج می‌شوند (کویی، ۲۰۰۵).

۵- روش سِواگ: معتدل‌ترین روش برای حذف پروتئین‌ها از محلول‌های پلی‌ساکاریدی اولین بار توسط سِواگ مطرح شد. این روش که به نام روش سِواگ معروف است؛ جداسازی را از طریق هم‌زدن و واسرشت کردن پروتئین‌ها در امولسیون کلروفرم انجام می‌دهد. بدین ترتیب، پروتئین‌ها به شکل ژل درمی‌آیند و پس از سانتریفیوژ کردن بین آب و کلروفرم باقی می‌مانند. در برخی مواقع به منظور تسهیل واسرشت‌سازی پروتئین‌ها، بافر با pH ۴-۵ را جایگزین آب می‌کنند و لازم است مقدار کمی

<sup>۱</sup> Pronase

<sup>۲</sup> Glycohydrolases

<sup>۳</sup> Trichloroacetic acid (TCA)

<sup>۴</sup> Sulfosalicylic acid

<sup>۵</sup> Celite



۱- بوتانل یا ۱-پنتانل نیز افزوده شود. با استفاده از این روش مقدار کمی از پروتئین‌ها حذف می‌شوند و برای حذف تمامی پروتئین‌ها، تکرار آن ضروری است اما خطر از دست دادن بخشی از پلی‌ساکاریدها نیز وجود دارد. از این روش ترجیحاً پس از سایر روش‌های خالص‌سازی استفاده می‌شود تا مقرون به صرفه باشد و همچنین باید توجه داشت که روش سواگ برای خالص‌سازی لیپوپلی‌ساکاریدها به دلیل حل‌پذیری کم و زیاد آن‌ها در کلروفرم مناسب نیست (استایوب<sup>۱</sup>، ۱۹۶۵).

#### ۱-۴- حذف سایر ناخالصی‌ها

در اکثر موارد پلی‌ساکاریدهای استخراج شده به خالص‌سازی با روش‌های مختلف به منظور همگن‌سازی و آنالیز بهتر ساختارشان نیاز دارند. لذا جداسازی ترکیبات نامطلوب می‌تواند بر اساس تفاوت در حلالیت، وزن مولکولی و ویژگی‌های کروماتوگرافی آن‌ها انجام شود.

الف) حذف ناخالصی‌ها بر اساس تفاوت در میزان حلالیت: حلالیت پلی‌ساکاریدها در محلول‌های آبی با افزودن، ترکیبات مختلف تغییر می‌کند. معمولاً الکل، ید، مس، باریم و نمک‌های آمونیوم برای کاهش حلالیت پلی‌ساکاریدها به کار می‌روند و موجب ترسیب آن‌ها می‌شوند (آندرسون<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۶). آمیلوز در ترکیب با بوتانل نامحلول می‌شود بنابراین، می‌توان در پلیمرهای حاوی نشاسته، آمیلوز و آمیلوپکتین را از هم جدا کرد. همچنین بتا گلوکان‌ها در ترکیب با کونگو رد<sup>۳</sup> یا کالکوفلور<sup>۴</sup> و بیشتر پلی‌ساکاریدهای آنیونی با نمک‌های ستیل‌پیریدینیوم<sup>۵</sup> نامحلول می‌شوند. کاپا کاراجینان در حضور نمک‌های پتاسیم نامحلول است درحالی‌که آلژینات‌ها و پکتین‌های کم متوکسیل با یون‌های کلسیم ته‌نشین می‌شوند. چند روش برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای مختلف بر اساس حلالیت متفاوت یا ته‌نشینی انتخابی وجود دارد. مثلاً بتاگلوکان‌ها از آرابینوزیلان‌ها در استخراج آبی از جو به روش رسوب با سولفات آمونیوم<sup>۶</sup> (۲۰-۵۰٪) بیشتر از آرابینوزیلان‌ها (۵۵-۹۵٪) ته‌نشین می‌شوند (کویی، ۲۰۰۵).

<sup>۱</sup> Staub

<sup>۲</sup> Andersson

<sup>۳</sup> Congo red

<sup>۴</sup> Calcofluor

<sup>۵</sup> Cetylpyridinium salts

<sup>۶</sup> Ammonium sulphate

ب) حذف ناخالصی‌ها بر اساس تفاوت در وزن مولکولی: اولترا سانتریفیوژ<sup>۱</sup>، اولترا فیلتراسیون غشایی<sup>۲</sup> و فیلتراسیون ژلی<sup>۳</sup> برای خالص‌سازی ترکیبات به کار می‌روند که اساس اصلی جداسازی این روش‌ها تفاوت در وزن مولکولی و ترکیب پلی‌ساکاریدها است. آرابینوزیلان‌های محلول در آب و آرابینوگالاکتان-پپتید، هر دو در آرد گندم وجود دارند. جداسازی جزئی این دو به دلیل تفاوت زیاد در وزن مولکولی بین آن‌ها با فیلتراسیون ژلی در سفارز<sup>۴</sup> 4B انجام می‌شود (شکل ۱-۵). جداسازی کامل این پلی‌ساکاریدها بعد از تیمار با سولفات‌آمونیم اشباع انجام می‌شود، زیرا بخش آرابینوزیلان رسوب می‌کند درحالی‌که آرابینوگالاکتان محلول باقی می‌ماند (آندرسون و همکاران، ۲۰۰۶).

ج) حذف ناخالصی‌ها بر اساس کروماتوگرافی: اطمینان از خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای تهیه شده به روش‌های مختلفی امکان‌پذیر است. برای مثال مقدار نیتروژن در نمونه نشان‌دهنده سطح آلوده‌کننده-های پروتئینی است. لذا پس از تکرار مراحل خالص‌سازی، نسبت ثابت و پایدار ترکیبات مونوساکارید و قندها، نشان‌دهنده خلوص پلی‌ساکاریدهای تهیه شده است. پروفایل شست‌وشو (تعداد پیک‌ها، اندازه و تناسب پیک‌ها) حاصل از هر دو کروماتوگرافی تبادل یون<sup>۵</sup> و اندازه‌پردی<sup>۶</sup> خلوص پلی‌ساکاریدهای تهیه شده را نشان می‌دهند (کویی، ۲۰۰۵).

ترکیبات غیر دیواره سلولی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، فنول‌ها و قندهای آزاد می‌توانند با روش‌های مختلف استخراج، حذف شوند. جداسازی پلی‌ساکاریدهای دیواره<sup>۷</sup> سلولی اغلب با آماده‌سازی بخش-های نامحلول در الکل آغاز می‌شود به این صورت که مواد گیاهی همگن شده یا به خوبی آسیاب شده در محلول داغ آبی اتانل<sup>۸۰</sup> یا ۹۰٪ توزیع می‌شوند و سپس با اتانل مطلق و اتر یا استون شسته می‌شوند (آندرسون و همکاران، ۲۰۰۶).

---

<sup>۱</sup> Ultra centrifugation

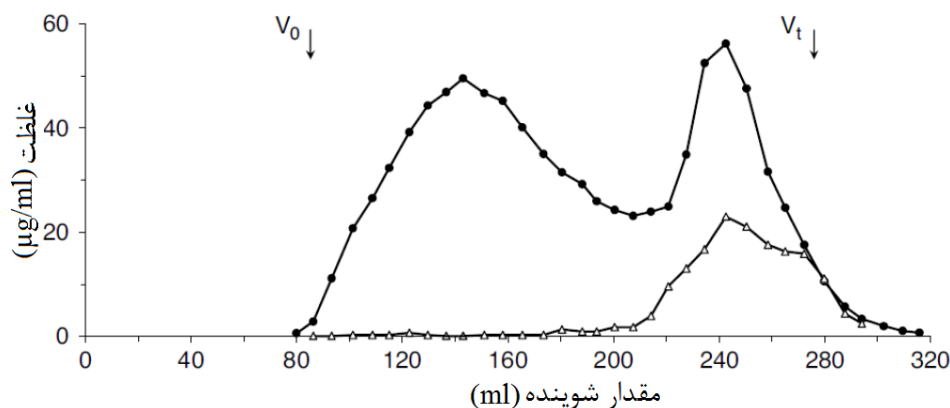
<sup>۲</sup> Membrane ultrafiltration

<sup>۳</sup> Gel filtration

<sup>۴</sup> Sepharose

<sup>۵</sup> Ion exchange

<sup>۶</sup> Size exclusion



شکل ۱-۵: فیلتراسیون ژلی با سفارز 4B از عصاره آبی آرد گندم حاوی آرابینوزیلان (پیک اول) و آرابینوگالاکتان-پیتید (پیک دوم).  $V_0$  و  $V_t$  به ترتیب بستر خالی و کل بستر ستون را نشان می‌دهند (آندرسون و همکاران، ۲۰۰۶).

### ۱-۵- ترسیب پلی ساکاریدها

پس از طی انواع مراحل خالص‌سازی، پلی ساکاریدهای باقی مانده در سه یا چهار حجم اتانل یا استون رسوب داده می‌شوند. معمولاً پلی ساکاریدها توسط رسوب‌دهی با الکل از اجزای عصاره آبی جداسازی می‌شوند. گاهی در ادامه ترسیب با اتانل، مقدار کمی از محلول اسید استیک برای جداسازی پلی ساکاریدهای آزاد شده از نمک به کار می‌رود. پلی ساکاریدهای رسوب داده شده با الکل، تحت تأثیر غلظت (پلی ساکاریدها در محلول‌های بسیار رقیق رسوب نمی‌کنند) و وزن مولکولیشان (پلی ساکاریدهای با وزن مولکولی کم، در الکل ته‌نشین نمی‌شوند) قرار دارند. در نهایت پلی ساکاریدها پس از دیالیز گسترده محلول به جهت اطمینان از حذف نمک‌های با وزن مولکولی کم و یا محصولات حاصل از تجزیه آنزیمی به روش انجمادی، خشک می‌شوند (سریواستاوا و همکاران، ۱۹۸۹؛ کویی، ۲۰۰۵).

### ۱-۶- شناخت و تشخیص ساختمان شیمیایی مولکولی

از گذشته تا کنون چندین میلیون ترکیب آلی شناخته شده و هر ساله هزاران ترکیب جدید ساخته می‌شود، که بیش از ۹۰٪ این ترکیبات در دانشگاه‌ها و مراکز صنعتی تهیه شده و مابقی از منابع طبیعی استخراج می‌شوند (بالسی، ۱۳۸۹). در سال‌های اخیر نیز، تعدادی از پلی ساکاریدها با فعالیت زیستی از منابع طبیعی جداسازی شده‌اند و توجه بسیاری از شیمی‌دانان علوم زیستی و داروسازان را به خود جلب کرده‌اند. تفاوت در بسیاری از فعالیت‌های زیستی پلی ساکاریدها تحت تأثیر تفاوت در

ساختار شیمیایی آن‌ها است از این‌رو، ساختار شیمیایی و ترکیب زنجیر پلی‌ساکاریدها برای فهم بیولوژیکی آن‌ها مهم است. برای مثال فعالیت ایمنی‌شناسی آرابینوگالاکتان استخراج شده از گیاه کلورلا پیرنویدوسا<sup>۱</sup> بستگی به وزن مولکولی آن دارد. آرابینوگالاکتان‌های با وزن مولکولی بالا فعالیت ایمنی‌شناسی از خود نشان می‌دهند اما انواع وزن مولکولی کم، این ویژگی را ندارند. تحقیقات نشان داده است که فعالیت پلی‌ساکاریدها تنها مربوط به ترکیبات شیمیایی آن‌ها نیست، بلکه به موقعیت زنجیرها در ساختار آن‌ها نیز بستگی دارد. پلی‌ساکاریدها معمولاً ترکیبی از مونوساکاریدهای مختلف با باندهای گلیکوزیدی متفاوت و اغلب پرشاخه و درشت مولکول هستند. لذا، توضیح ساختمان‌های شیمیایی و ترکیب زنجیر پلی‌ساکاریدها کار آسانی نیست (یانگ<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۹)، و از آنجاییکه لازمه شناسایی و بررسی هر ترکیب (جزء مورد نظر ممکن است عنصر، رادیکال گروه فعال، ترکیب و یا مجموعه‌ای از ترکیبات باشد) جدید، آنالیز آن است. در ابتدا، به انواع روش‌های آنالیز پرداخته می‌شود. روش‌های آنالیز به دو گروه تقسیم می‌شوند:

- روش‌های کلاسیک (شیمیایی و فیزیکی): در این روش‌ها، اندازه‌گیری با استفاده از وسایل ساده<sup>۳</sup> آزمایشگاهی و بکارگیری واکنش‌های شیمیایی انجام می‌شود. در این روش‌ها اندازه‌گیری حجم و وزن مواد، ضروری است.

- روش‌های دستگاهی<sup>۴</sup>: در این روش، برای اندازه‌گیری از دستگاه‌های پیچیده که بر اساس خواص فیزیکی (نور، حرارت و غیره) عمل می‌کنند، استفاده شده و خصوصیت فیزیکی مواد مورد آزمایش به اجزای تشکیل‌دهنده<sup>۵</sup> آن‌ها ارتباط داده می‌شود.

مراحل آماده‌سازی روش‌های دستگاهی نیز شیمیایی است. مانند نمونه‌گیری، حل کردن، تغییر حالت اکسیداسیون، حذف مواد مزاحم، تعیین pH، افزودن ماده<sup>۶</sup> کمپلکس‌کننده، رسوب دادن، تغلیظ کردن و غیره که از اجزای جدایی‌ناپذیر روش‌های دستگاهی هستند (حسینی، ۱۳۸۴).

---

<sup>۱</sup> *Chlorella pyrenoidosa*

<sup>۲</sup> Yang

<sup>۳</sup> Instrumental

از جمله رایج‌ترین روش‌های آنالیز دستگاهی موجود عبارتند از:

۱- طیف‌سنجی فرو سرخ (IR)<sup>۱</sup>.

۲- طیف‌سنجی فرابنفش (UV)<sup>۲</sup>.

۳- طیف‌سنجی جرمی (MS)<sup>۳</sup>.

۴- طیف‌سنجی اشعه ایکس<sup>۴</sup>.

۵- طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR)<sup>۵</sup>.

۶- تجزیه عنصری

پژوهشگران با تحلیل طیف‌های حاصل از این روش‌ها جنبه‌های ساختاری ترکیبات را شناسایی می‌کنند. بدین ترتیب که، شیمیدان‌ها با استفاده از این تجزیه و تحلیل تشکیل محصول مورد نظر را در واکنش، مورد بررسی قرار می‌دهند (بالسی، ۱۳۸۹). از مزایای روش‌های دستگاهی؛ اندازه‌گیری بسیار سریع (گاهی در ۰/۰۱ ثانیه)، نمونه مورد نیاز کم و دقت اندازه‌گیری بالا است (حسینی، ۱۳۸۴). ساختمان شیمیایی ترکیبات توسط NMR-FTIR در حالت مایع (یک یا دو بعدی)، NMR جامد، طیف‌سنجی NMR، کروماتوگرافی گازی<sup>۶</sup>، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۷</sup> تجزیه و آنالیز می‌شوند و ترکیب شاخه‌های پلی‌ساکاریدها در محلول‌ها با استفاده از پراکندگی دینامیکی نور بررسی می‌گردند. بطور کلی، پلی‌ساکاریدها از نظر شیمیایی و ساختاری در ترکیبات شیمیایی، پیکربندی (آرایش فضایی اتم‌های اکسیژن و هیدروژن در اطراف هر اتم کربن) و ساخت (چرخش ایزومری گروه‌ها مانند گروه‌های هیدروکسیل و حلقه‌های پیرانوزی) متفاوتند. برای درک بهتر خصوصیات و عملکرد پلی‌ساکاریدها، مدل ساختمانی و آرایش مولکولی آن‌ها باید تخمین زده شود. ساختمان شیمیایی پلی‌ساکاریدها عبارت است از ترکیبی از قندها، باندهای گلیکوزیدی و

---

<sup>۱</sup> Infrared

<sup>۲</sup> Ultra violet

<sup>۳</sup> Mass spectroscopy

<sup>۴</sup> X-ray spectroscopy

<sup>۵</sup> Neocleic magnetic resonance

<sup>۶</sup> Gas chromatography (GC)

<sup>۷</sup> High performance liquid chromatography (HPLC)

ساختار شاخه‌ها که با تفسیر طیف‌های شیمیایی و کروماتوگرافی تعیین می‌شوند (فاطمی، ۱۳۸۶؛ یانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

#### ۱-۶-۱- روش‌های شیمیایی

#### ۱-۱-۶-۱- تعیین وزن مولکولی

تا اوایل دهه ۱۹۸۰، آنالیز طیف‌جرمی مشتقات کربوهیدرات‌ها محدود بود؛ و تنها ترکیبات با وزن مولکولی حدود ۲۰۰۰ دالتون قابل تشخیص بودند. ۱۰ سال بعد از آن، دقت دستگاه‌ها تا وزن ۱۵۰۰۰ دالتون گسترش یافت و پس از آن، با ابداع روش‌های الکترواسپری<sup>۱</sup> و یونیزاسیون لیزر<sup>۲</sup>، امکان آزمون‌های بی‌نقص پلیمرهای زیستی با وزن مولکولی ۱۰۰/۰۰۰ دالتون هم فراهم شد. این امر نشان از دسترسی اخیر به ساختمان شیمیایی پلی‌ساکاریدها با کمک طیف‌سنج جرمی دارد و توانایی این ابزار در آنالیز و تعیین توالی پیوندها و وزن مولکولی را بیان می‌کند (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸). طیف‌سنج جرمی، اطلاعات مربوط به وزن مولکولی یا وزن فرمولی یک ترکیب را ارائه می‌دهد. لذا، از طیف‌سنج جرمی با قدرت تشخیص بالا<sup>۳</sup> برای تعیین فرمول تجربی مولکول استفاده می‌شود. اما ممکن است صدها ایزومر ساختاری دیگر با فرمول تجربی یکسان وجود داشته باشد که این امر شناسایی ایزومرها را دشوار می‌کند (بالسی، ۱۳۸۹).

تشخیص ساختمان پلی‌ساکاریدها بدون تخمین اندازه مولکولی و روش‌های شیمیایی کامل نیست. برای مثال، ساختمان پلی‌ساکاریدها می‌تواند از طریق اتصال پلی‌ساکاریدهای کوچکتر به انتهای احیاکننده شناسایی شود. برای ترکیبات با زنجیرهای بلندتر نیز به روش‌های فیزیکی نیاز است. از روش‌های فیزیکی با دقت طیف‌سنجی جرمی می‌توان به اسمزسنج<sup>۴</sup>، سانتیفریوژ فوق‌سریع و پراکنش نوری<sup>۵</sup> اشاره کرد.

---

<sup>۱</sup> Electrospray

<sup>۲</sup> Laser ionization

<sup>۳</sup> High resolution mass spectroscopic (HRMS)

<sup>۴</sup> Osmometry

<sup>۵</sup> Light scattering

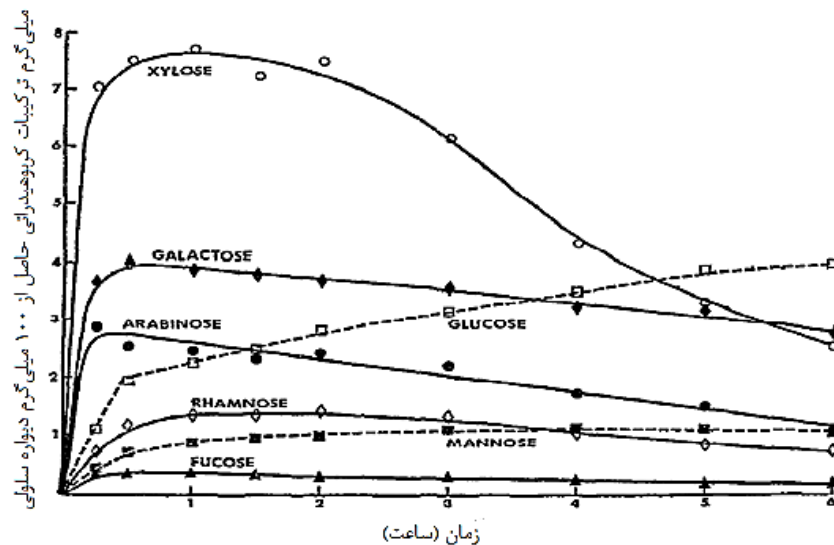
در برخی از مواقع برای تعیین وزن مولکولی از روش‌های جداسازی نیز استفاده می‌شود برای نمونه، فیلتراسیون ژلی برای این منظور به کار می‌رود (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸).

#### ۱-۶-۱-۲- تعیین مونساکاریدهای سازنده

پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی گیاهان ترکیبی از نسبت‌های مختلف مونساکاریدهای خنثی مانند: رامنوز، فوکوز، آرابینوز، زایلوز، مانوز، گالاکتوز، گلوکز و مونساکاریدهای اسیدی مانند اسید گالاکتورونیک، اسید گلوکولونیک و ۴-۰-متیل اسید گلوکورونیک هستند؛ و سایر مونساکاریدهای شناخته شده به مقدار ناچیزی وجود دارند (رولستاد و همکاران، ۲۰۰۵). لذا، برای تعیین ساختمان اولیه پلی‌ساکاریدها، شناخت ترکیبات قندها در مولکول و نسبت آنها ضروری است. روش کار برای این منظور، شناخت پیوندها و توالی آنها و شناسایی تکرار توالی الیگوساکاریدها است. برای شناسایی مونساکاریدها، معمولاً پلیمرها را با اسید هیدرولیز می‌کنند و مشخصات و میزان قندهای حاصله، با روش‌های کروماتوگرافی سنجیده می‌شود (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸). قابلیت هیدرولیز اسیدی مونساکاریدها با پیوندهای مختلف گلیکوزیدی متفاوت است، همچنین قابلیت رها شدن مونو-ساکاریدها در اسید نامشخص است لذا می‌توان با کمترین آسیب به مونساکاریدها، پلی‌ساکاریدها را تا حد امکان هیدرولیز کرد (رولستاد و همکاران، ۲۰۰۵). برای هیدرولیز پلی‌ساکاریدها از اسید تری‌فلورواستیک استفاده می‌شود زیرا مونساکاریدهای حاصل از دیواره سلولی گیاهان به این طریق کمترین شباهت را با محصولات حاصل از هیدرولیز با اسیدهای معدنی دارند، و دیگر اینکه اسیدتری‌فلورواستیک به کمک تبخیر به راحتی حذف می‌شود. شکل ۱-۶ قندهای حاصل از دیواره سلولی لوبیای پینتو-هیپوکوتیل<sup>۱</sup>، هیدرولیز شده با اسید تری‌فلورواستیک<sup>۲</sup> ۲ نرمال در لوله‌های دربسته و دمای ۱۲۱°C در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد (آلبرشیم<sup>۲</sup> و همکاران، ۱۹۶۷).

<sup>۱</sup> Pinto- bean hypocotyls

<sup>۲</sup> Albersheim



شکل ۱-۶: تأثیر مدت زمان هیدرولیز بر تخمین ترکیبات کربوهیدراتی دیواره سلولی لوبیای پینتو-هیپوکوتیل. دیواره سلولی با اسید تری فلورواستیک ۲ نرمال در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  و مدت زمان‌های مختلف هیدرولیز شده است (آلبرشیم و همکاران، ۱۹۶۷).

#### ۱-۶-۱-۲-۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

چندین دهه است که از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به عنوان روشی رایج در آنالیز مونو- ساکاریدهای آزاد شده از هیدرولیز پلی ساکاریدها (به منظور جداسازی و شناخت کربوهیدرات‌ها) استفاده می‌شود. HPLC قادر به تعیین ماتریکس‌های پیچیده مونو و الیگوساکاریدها است. در این روش انواع مختلف فازهای ثابت، شوینده‌ها و آشکارسازها<sup>۱</sup> برای آنالیز کربوهیدرات‌ها قابل استفاده هستند. HPLC به علت آنالیز سریع و عدم نیاز به مشتق‌سازی نمونه قبل از آنالیز، نسبت به کروماتوگرافی گازی ارجحیت دارد (برومر و همکاران، ۲۰۰۶) و از آنجاییکه تشخیص کربوهیدرات‌ها با آشکارساز UV به دلیل تداخل احتمالی در محدوده زیر UV که قند در آن جذب دارد غیر عملی است، آشکارسازهای ضریب شکست<sup>۲</sup> با حساسیت ۱ میلی گرم رواج بیشتری پیدا کرده‌اند. درحالی‌که، در صورت استفاده از آشکارسازهای ضریب شکست در HPLC، نمی‌توان از شست‌وشوی گرادیانی استفاده نمود لذا، در بسیاری از نمونه‌های قندی، غلظت قند به گونه‌ای است که در دامنه حساسیت دستگاه قرار دارد.

<sup>۱</sup> Detectors

<sup>۲</sup> Refractive index (RI)



همچنین، از کروماتوگرافی فاز نرمال<sup>۱</sup> با ستون‌های حاوی ترکیبات آمین باند شده، به طور گسترده در آنالیز قندها استفاده می‌شود. مشکلی که در مورد ستون‌های نام‌برده وجود دارد این است که قندهای احیاکننده می‌توانند با عوامل آمینی ترکیب شوند. این واکنش عمر ستون را کاهش داده و بخشی از قند قابل اندازه‌گیری نخواهد بود (جبل‌جوان و همکاران، ۱۳۹۳). چندین روش کروماتوگرافی برای جداسازی پلی‌ساکاریدها از یکدیگر و آلوده‌کننده‌های غیرکربوهیدراتی وجود دارد. برای نمونه، کروماتوگرافی ژل تراوایی برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای خنثی از اسیدهای اورونیک مناسب است. جداسازی این بیوپلیمرها بر اساس وزن مولکولی و حجم هیدرودینامیکشان می‌باشد. برای مثال آرابینوزیلان‌ها و آرابینوگلیکان‌ها بخوبی با کروماتوگرافی ژل تراوا و ستون سفارز جداسازی می‌شوند (شکل ۱-۵). کروماتوگرافی تبادل یون با دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز<sup>۲</sup> بخصوص، برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای خنثی از اسیدی مناسب است. زیرا پلی‌ساکاریدهای خنثی بدون برقراری پیوند عبور می‌کنند و آن‌هایی که بار منفی دارند در ستون باقی می‌مانند و به تدریج با افزایش قدرت یونی بافر یا pH از ستون شسته می‌شوند. کروماتوگرافی میل‌ترکیبی<sup>۳</sup> نیز بر اساس پیوندهای غیرقطبی بخصوصی بین لیگاند چسبیده به ستون و پلی‌ساکاریدها عمل می‌کند که از قدرتمندترین روش‌ها برای خالص‌سازی مطمئن پلیمرهای کربوهیدراتی است (کویی، ۲۰۰۵).

#### ۱-۶-۱-۲-۲- کروماتوگرافی گازی (GC)

کروماتوگرافی گازی اولین بار در سال ۱۹۵۲ مطرح شد و از سال ۱۹۵۶ به صورت تجاری مورد استفاده قرار گرفت. امروزه GC نسبت به انواع اولیه خود پیشرفت زیادی کرده و هم اکنون به عنوان زمینه و رشته‌ای تکامل یافته در نظر گرفته می‌شود که نزدیک به محدودیت‌های نظری آن است.

بخش‌های اصلی دستگاه GC (شکل ۱-۷) عبارتند از:

#### ۱- مخزن گاز<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> Normal-phase chromatography

<sup>۲</sup> Diethyl aminoethyl (DEAE)-cellulose

<sup>۳</sup> Affinity chromatography

<sup>۴</sup> Gas supply

۲- بخش تزریق<sup>۱</sup>

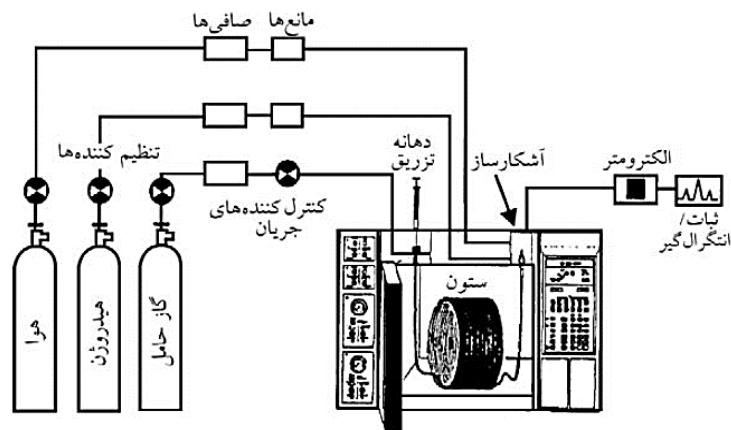
۳- ستون

۴- آشکارساز

۵- گرمکن<sup>۲</sup>

۶- ثبت کننده الکترونی و سیستم پردازش داده<sup>۳</sup>.

GC روشی مناسب برای آنالیز ترکیبات فرار و مقاوم به حرارت است. از GC برای آنالیز بسیاری از ترکیبات مانند اسیدهای چرب، تری گلیسیریدها، کلاسترول و دیگر استرولها، آنالیز حلالهای آبی، الکلی، اسیدهای آمینه و پپتیدها، ویتامینها، حشره کشها، علف کشها، افزودنیهای خوراکی، ضد اکسندها، نیتروز آمینها، پلی کلرینت بی فنیلها<sup>۴</sup>، داروها، ترکیبات طعمی و بسیاری از ترکیبات دیگر استفاده می شود. همچنین، GC از روشهای قدیمی است که برای جداسازی و تعیین کربوهیدراتها استفاده می شود (بروممر و همکاران، ۲۰۰۶؛ کیان، ۲۰۱۰).



شکل ۱-۷: شمای اجزای دستگاه GC (جهان بین، ۱۳۹۰).

فرار بودن نمونه از پیش نیازهای جداسازی به روش GC است. به علت فرار نبودن مونوساکاریدها ابتدا باید آنها را مشتق سازی کرد. اغلب مونوساکاریدهای خنثی برای آنالیز با GC باید به مشتقات

<sup>۱</sup> Injection port

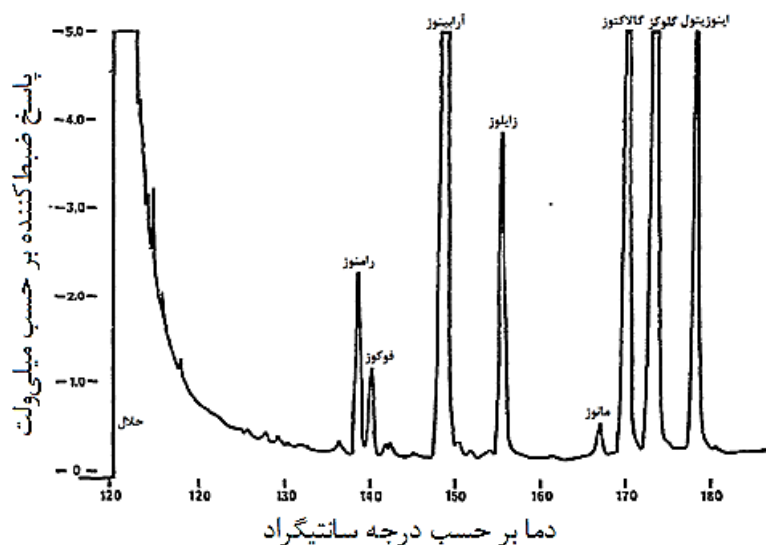
<sup>۲</sup> Oven

<sup>۳</sup> Electronics and recorder/data handling system

<sup>۴</sup> Polychlorinated biphenyls (PCBs)

استات‌های آلدیتول تبدیل شوند لذا در مشتق‌سازی قندهای طبیعی، کاهش آن‌ها به آلدیتول‌ها و سپس استیله کردن آن‌ها ضروری است. استات‌های آلدیتول حاصله در حلال مناسب حل شده و به ستون دستگاه GC تزریق می‌شوند (کویی، ۲۰۰۵). مشتقات استات‌های آلدیتول و تری‌متیل‌سلیل<sup>۱</sup> به ترتیب برای پلی‌ساکاریدهای خنثی و اسیدی استفاده می‌شوند. در مطالعه پلی‌ساکاریدها اغلب از آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای<sup>۲</sup> استفاده می‌شود. اما GC با آشکارساز جرمی نیز می‌تواند برای تصدیق شناخت استات‌های آلدیتول جداسازی شده استفاده شود (برومیر و همکاران، ۲۰۰۶).

در آشکارساز FID ترکیبات پس از شست‌وشو از ستون‌های آنالیز، در شعله هیدروژن می‌سوزند. ولتاژی که از شعله می‌گذرد متناسب با حضور یون‌های آلی ناشی از سوختن ترکیبات آلی است. جریان عبوری از شعله تقویت و ثبت می‌شود. پاسخ آشکارساز FID به ترکیبات آلی بر اساس وزن است، لذا آشکارساز مناسب برای آنالیت‌های غذایی با ترکیبات آلی است. این نوع آشکارساز بهترین پاسخ را به ترکیبات دارای پیوند C-C یا C-H می‌دهد. در این روش شوینده ستون در شعله می‌سوزد و از بین می‌رود (کیان، ۲۰۱۰). در شکل (۸-۱) پیک حاصل از GC پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی افرای شبه‌چناری<sup>۳</sup> آورده شده است.



شکل ۸-۱: آنالیز GC پلی‌ساکارید دیواره سلولی افرای شبه‌چناری (آلبرشیم و همکاران، ۱۹۶۷).

<sup>۱</sup> Trimethylsilyl (TMS)

<sup>۲</sup> Flame ionization detector (FID)

<sup>۳</sup> *Acer pseudoplatanus*

### ۱-۶-۱-۳- تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی

جهت تعیین موقعیت و نوع اتصالات گلیکوزیدی از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که از مهمترین آنها می‌توان به متیله کردن<sup>۱</sup>، هیدرولیز ناقص اسیدی (ملایم)<sup>۲</sup> و اکسایش اشاره کرد که در ادامه به ذکر جزئیات آنها می‌پردازیم (جهان‌بین، ۱۳۹۰).

### ۱-۶-۱-۳-۱- متیله کردن

در این روش گروه‌های هیدروکسیل در پلیمر تعویض نمی‌شوند، بلکه همه متیله می‌گردند و در اثر هیدرولیز پیوندهای داخلی، مونوساکاریدهای پاره‌ای متیله ایجاد می‌شوند. گروه‌های هیدروکسیل آزاد شده معمولاً شامل گروه‌های آنومری هستند که نشان‌دهنده موقعیت هر پیوند با دیگر مونوساکارید-های پلیمر است (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸). از این‌رو، بررسی پلی‌ساکاریدهای متیله شده از مراحل مهم شناسایی است زیرا متیله کردن باید به گونه‌ای انجام شود که بتوان اطلاعات مهمی در رابطه با اتصالات پلی‌ساکاریدها بدست آورد. در حال حاضر روش‌های متیله کردن متنوعی وجود دارند اما اغلب در متیله کردن اولیه قندها از روش‌های دیمسیل‌انیون<sup>۳</sup> یا هیدرولیز فلزات قلیایی (مانند سود) برای حذف پروتئین‌ها از هیدروکسیل‌های آزاد، استفاده می‌شود. معمولاً در این واکنش از حلال دی‌متیل‌سولفاکسید استفاده می‌شود، زیرا بسیاری از قندها را در حلال‌های آنهیدرو حل می‌کند و برای حل کردن پلی‌ساکاریدهای سنگین وزن در دی‌متیل‌سولفاکسید، ابتدا باید پلی‌ساکاریدها را به روش‌های شیمیایی یا آنزیمی هیدرولیز کرد و بعد پیوندها را مورد آنالیز قرار داد (کیم<sup>۴</sup> و همکاران، ۲۰۰۶). متیله کردن می‌تواند با استفاده از دی‌متیل‌سولفات و هیدروکسیدسدیم رقیق (شرایط هاورث) نیز انجام شود. اما اغلب از تیمار دیدمتیل و اکسید نقره (شرایط پریدات) استفاده می‌کنند (شکل ۱-۹) (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸).

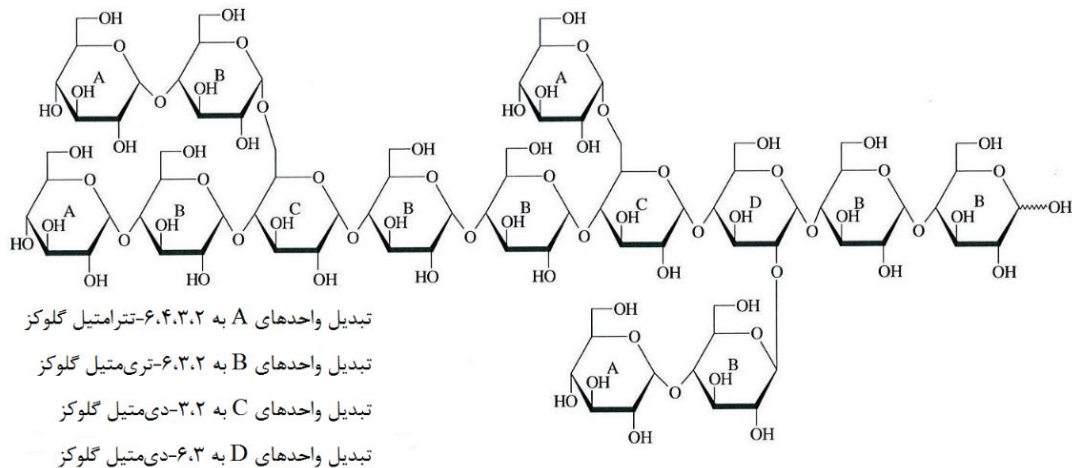
<sup>۱</sup> Methylation

<sup>۲</sup> Partial (mild) acid hydrolysis

<sup>۳</sup> Dimsylanion

<sup>۴</sup> Kim

با توجه به الگوی تکه‌های مشتقات ایجاد شده می‌توان نوع پیوندهای گلیکوزیدی را تعیین کرد. با متیله کردن پلی‌ساکاریدها می‌توان به شکل حلقه‌ها (پیرانوز یا فورانوز) و وضعیت انتهایی پلیمرها نیز پی برد (آندرسون و همکاران، ۲۰۰۶).



شکل ۱-۹: تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل قادر به متیله شدن در یک پلی‌ساکارید خاص (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸).

### ۱-۶-۱-۳-۲- هیدرولیز ناقص اسیدی (ملایم)

برای تعیین توالی قندها در زنجیر، دانستن موقعیت پیوندهای داخلی ضروری است. به همین منظور از روش‌های شیمیایی مانند هیدرولیز ناقص اسیدی، برای تعیین اجزای اصلی الیگوساکاریدهای خنثی استفاده می‌شود. در هیدرولیز ناقص اسیدی، برای حذف انتخابی بخش‌هایی از مولکول، از کاتالیزگر-های اسیدی استفاده می‌شود، این کاتالیزگرها از طریق پیوستن به پیوندهای نسبتاً ضعیف گلیکوزیدی، می‌توانند پلی‌ساکاریدها را هیدرولیز کنند. در روشی مشابه، اما با انتخاب‌گری متفاوت، استیله‌شدن و هیدرولیز کردن پلی‌ساکاریدها توسط آنهیدریداستیک و اسید سولفوریک نیز انجام می‌شود (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸). تجزیه پاره‌ای<sup>۱</sup> پلی‌ساکاریدها به روش هیدرولیز اسیدی بر اساس ناپایداری برخی پیوندهای گلیکوزیدی در برابر اسید نسبت به سایر پیوندها است برای مثال حلقه‌های فورانوزی و قندهای د-اکسی معمولاً پیوندهای گلیکوزیدی ضعیفی دارند و به راحتی با

<sup>۱</sup> Partial degradation

هیدرولیز اسیدی می‌شکنند. هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی ۶-د-اُکسی‌هگزوزها رامنوز، ۵ مرتبه سریع‌تر از هیدرولیز پیوندهای سایر هگزوزها است. اگر پلی‌ساکاریدها حاوی تعداد کمی پیوند گلیکوزیدی ناپایدار در برابر اسید باشند، در اثر هیدرولیز پاره‌ای، مخلوطی از مونوساکاریدها و الیگوساکاریدها بدست می‌آید. جزئیات ساختاری محصولات حاصل از هیدرولیز یا واحدهای پلی‌ساکاریدی شکسته شده اطلاعات معنی‌داری در رابطه با ساختار پلی‌ساکاریدها ارائه می‌دهند (کویی، ۲۰۰۵). مقدار مونوساکاریدهای خنثی رها شده در اثر هیدرولیز اسیدی به راحتی از استات‌های آلدیتول متناظر در کروماتوگرافی گاز-مایع تعیین می‌شود. از مشتقات دیگر مانند استات‌های آلدونونیتریل<sup>۱</sup> و استات‌های ۰-متیل‌اگزیم<sup>۲</sup> نیز، می‌توان استفاده کرد. پس از هیدرولیز اسیدی پلی‌ساکاریدها و آزاد شدن مونوساکاریدها، مقدار کمی مونوساکاریدها به روش کروماتوگرافی گاز-مایع یا HPLC تخمین زده می‌شود. البته آنالیز مونوساکاریدها به روش HPLC هنوز به اندازه روش کروماتوگرافی گاز-مایع رایج نشده است (آندرسون و همکاران، ۲۰۰۶).

#### ۱-۶-۱-۳-۳-اکسایش پریدات

اکسایش کربوهیدرات‌ها با یون پریدات از زمان‌های طولانی به عنوان روش قدیمی برای تعیین ساختار کربوهیدرات‌های پیچیده به کار می‌رفته است. در این آزمون از پریدات می‌توان برای معرفی آلدهیدهای پلی‌ساکاریدها یا گلیکوپروتئین‌ها استفاده کرد. در بیولوژی و بیوشیمی این روش به اختصار PAS<sup>۳</sup> نامیده می‌شود. این روش بر اساس واکنش بین معرف شیف<sup>۴</sup> و اشکال آلدهیدها است که در اثر اکسایش توسط پریدات، کربوهیدرات‌ها تغییر رنگ می‌دهند. با استفاده از تتراستات‌سرب (pb (oAc)<sub>4</sub>) نیز همان نوع اکسایش رخ می‌دهد و محصول این واکنش نیز، پریدات است (کریستنسن<sup>۵</sup> و همکاران، ۲۰۱۰).

<sup>۱</sup> Aldononitrile acetates

<sup>۲</sup> O-methyloxime acetates

<sup>۳</sup> Periodate-schiff base

<sup>۴</sup> Schiff

<sup>۵</sup> Kristiansen

واحدهای کربوهیدرات حاوی گروه گلیکول در نزدیکی اتم‌های کربن به دی‌آلدهیدها اکسید می‌شوند. اگر واحدها دارای سه گروه هیدروکسیل مجاور هم باشند، اسید فرمیک تولید می‌شود. همچنین، گروه‌های آلدهید با گروه‌های هیدروکسیل اکسید نشده، تشکیل پیوند همی‌استال می‌دهند، در نتیجه این واکنش تفسیر داده‌ها را پیچیده می‌کند (پازور<sup>۱</sup>، ۱۹۹۴). یون‌های خاص پریدات در مجاورت دیول‌ها، با ساختارهایی مانند ۲-هیدروکسی آلدهیدها، ۱و۲-دی‌کربونیل‌ها، آلفا-هیدروکسی و آلفا-کتو اسیدها و همچنین آمینو الکل‌ها ارتباط نزدیکی دارند. به نظر می‌رسد اکسایش ساختار پلی-ساکاریدها تا زمانیکه میزان اکسیدشدن نسبتاً کم شود، ادامه داشته باشد. برای اکسیدشدن دیول‌های مجاور، باید گروه‌های OH به موقعیت استوایی-استوایی یا محوری-استوایی تمایل داشته باشند، زیرا گروه‌های OH که در مجاورت موقعیت سخت محوری-محوری قرار دارند، نمی‌توانند واکنش دهند (کریستنسن و همکاران، ۲۰۱۰).

#### ۱-۶-۲- روش‌های آنزیمی

آنزیم‌ها ترکیباتی پروتئینی هستند که به منزله کاتالیزورهای حیاتی سبب تغییرات مطلوب یا نامطلوب فیزیکی و شیمیایی در مواد غذایی می‌شوند. اکثر آنزیم‌ها در مقایسه با کاتالیزورهای متداول شیمیایی، دارای سرعت عمل بالاتری هستند و بصورت کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند. به طور کلی این اختصاصی عمل کردن آنزیم‌ها ویژگی بسیار خوبی جهت شناسایی برخی مواد محسوب می‌شود و در بررسی‌های علمی به طور مشخصی مورد استفاده قرار می‌گیرد (فاطمی، ۱۳۸۶).

پلی‌ساکاریدها قابلیت هیدرولیز در حضور آنزیم‌ها را دارند لذا از هیدرولیز آنزیمی به عنوان روش اختصاصی برای تعیین نوع موقعیت پیوند گلیکوزیدی در پلی‌ساکاریدها استفاده می‌شود. برای استفاده از این روش باید آنزیم‌های اختصاصی و کاملاً خالص در دسترس باشد. موقعیت آنومری پیوندهای گلیکوزیدی در برخی از پلی‌ساکاریدها کاملاً یکسان است درحالی‌که در پیوندهای گلیکوزیدی سایر پلی‌ساکاریدها، هر دو نوع موقعیت آنومری (آلفا و بتا) وجود دارد، لذا برای تعیین پیکربندی پیوندها

---

<sup>۱</sup> Pazur

در این دسته نیاز به چند نوع آنزیم است. از این رو، آنزیم‌هایی که مختص یک نوع آنزیم هستند، برای حذف واحدهای انتهایی پلی‌ساکارید استفاده می‌شوند و از دیگر آنزیم‌ها برای حذف سایر واحدها استفاده می‌کنند و بر اساس نتایج هر دو، موقعیت همه پیوندها مشخص می‌شود (پازور، ۱۹۹۴). از طرف دیگر، گاهی از آنزیم‌های اندو برای شکستن زنجیرها در نقاط مونوساکاریدی مرکزی و ایجاد الیگوساکارید و از آنزیم‌های اگزو برای جداکردن انتهای غیراحیاکننده و ایجاد مونو و دی‌ساکارید استفاده می‌شود (کولینس و همکاران، ۱۹۹۸).

### ۱-۶-۳- روش‌های طیف‌سنجی

به اندازه‌گیری و تفسیر طیف حاصل از برهم‌کنش ماده با تابش الکترومغناطیس طیف‌سنجی می‌گویند. برای حل بسیاری از مشکلات آزمون‌های آنالیزی، روش‌های طیف‌سنجی متنوعی وجود دارد. این روش‌ها به نسبت نوع آنالیز (طیف‌سنجی مولکولی یا اتمی)، نوع برهم‌کنش اشعه-ماده (جذب، نشر یا انکسار) و ناحیه الکترومغناطیسی که طیف ایجاد می‌شود با هم متفاوتند لذا از آزمون‌های طیف‌سنجی، اطلاعات مفیدی بدست می‌آید که به طور گسترده برای آنالیزهای کمی و کیفی مورد استفاده قرار می‌گیرند (پننر<sup>۱</sup>، ۲۰۱۰).

### ۱-۶-۳-۱- درجه چرخش نوری<sup>۲</sup> (پلاریمتری)

تعیین میزان چرخش نوری از آزمون‌های مهم آنالیز قندها و شیمی کربوهیدرات‌ها در گذشته بوده است. اگرچه در حال حاضر تعیین میزان چرخش نوری کمترین اهمیت را در شناسایی قندها دارد اما هنوز میزان چرخش نوری مشتقات کربوهیدرات‌ها در مقالات مختلف گزارش می‌شود. قندها، ترکیبات نامتقارنی هستند که موجب تغییر جهت نور خطی حاصل از لامپ پلاریزه می‌شوند. لذا فعالیت نوری ترکیبات نامتقارن مانند قندها در محلول، به روش پلاریمتری بررسی و با اندازه‌گیری درجه چرخش گزارش می‌شود. میزان چرخش دو ترکیب، به سرعت‌های متفاوت و میزان حلالیت آن‌ها بستگی دارد. از این رو چرخش ویژه قندها  $[\alpha]$  را همراه با دما و طول موج معین نشان می‌دهند (لیندهورست،

<sup>۱</sup> Penner

<sup>۲</sup> Specific optical rotation



۲۰۰۳). چرخش ویژه قندها با استفاده از معادله (۲-۱) محاسبه می‌شود. در این معادله  $[\alpha]$  چرخش ویژه قند،  $\alpha$  میزان چرخش مشاهده شده بر حسب درجه،  $C$  غلظت محلول قندی بر حسب  $g/ml$ ،  $l$  طول مسیر عبور نور در سلول بر حسب  $dm$  و  $D$  اندازه طول موج نور ساطع شده از لامپ سدیم است (جبلی‌جوان و همکاران، ۱۳۹۳).

$$\text{معادله (۲-۱): } [\alpha]_D = \frac{\alpha}{C \times l} = \text{چرخش ویژه}$$

#### ۱-۶-۳-۲- طیف‌سنجی فرابنفش و مرئی

از طیف‌سنجی UV، برای شناسایی ساختارهای حاوی مولکول‌های مزدوج استفاده می‌شود (بالسی، ۱۳۸۹). مدت‌های زیادی است که آزمون‌های رنگ‌سنجی برای قندهای ساده و پلی‌ساکاریدها، مورد استفاده قرار می‌گیرند. قندهای ساده، الیگوساکاریدها، پلی‌ساکاریدها و مشتقات آن‌ها دارای اثرهای-متیل آزاد یا گروه‌های مستعد آزاد شدن هستند. لذا زمانیکه قندها تحت تیمار فنول و اسید سولفوریک غلیظ قرار می‌گیرند تشکیل رنگ زرد-نارنجی می‌دهند. رنگ ایجاد شده ثابت است و مدت زیادی دوام دارد. امروزه استفاده از واکنش فنول-اسید سولفوریک، برای تعیین مقادیر کم قندها و مواد مربوط به آن‌ها گسترش یافته است. جذب رنگ زرد-نارنجی در ۴۹۰ میلی‌میکرومتر مربوط به هگروزها و در ۴۸۰ میلی‌میکرومتر مربوط به پنتوزها و اسیدهای اورونیک است. با استفاده از منحنی‌های استاندارد از قبل تهیه شده برای بخشی از قندهای مورد آزمون، می‌توان مقدار قند را تعیین کرد (دووبویس<sup>۱</sup> و همکاران، ۱۹۵۶).

#### ۱-۶-۳-۳- طیف‌سنجی مادون قرمز

طیف‌سنجی مادون قرمز در مورد برهم‌کنش تابش امواج مادون قرمز با ماده بحث می‌کند. طیف سنج‌های IR از سال ۱۹۴۰ میلادی به طور تجاری در دسترس قرار گرفته‌اند و امروزه یکی از مهم‌ترین ابزارهای آنالیز مورد استفاده شیمی‌دانان هستند. در ناحیه IR، تمام مولکول‌ها بجز مولکول‌های دو اتمی یکسان مانند  $O_2$ ،  $N_2$  و غیره دارای جذب هستند. طیف IR یک ترکیب می‌تواند اطلاعات

<sup>۱</sup> Dubois

مهمی درباره ساختار مولکولی و طبیعت شیمیایی ماده ارائه کند. اغلب با اندازه‌گیری مقدار جذب تابش، نشر و انعکاس IR، طیف حاصل می‌شود. تمام ترکیبات آلی تابش مادون قرمزی را که مطابق با انرژی ارتعاش‌های آن‌هاست جذب می‌کنند و نوعی طیف جذبی ایجاد می‌شود که انعکاس منحصر بفردی از ساختار مولکولی آن‌هاست. معمولی‌ترین محدوده طیف‌سنجی IR با بیشترین کاربرد در ناحیه  $4000-600 \text{ cm}^{-1}$  قرار دارد. طیف‌سنجی IR اطلاعاتی در مورد گروه‌های عاملی موجود در مولکول (مانند COOR، COR، CN، NO<sub>2</sub> و غیره) فراهم می‌کند (بالسی، ۱۳۸۹؛ جوانبخت و همکاران، ۱۳۸۶). همچنین طیف IR برای تعیین موقعیت آنومری<sup>۱</sup> و بررسی پلی‌ساکاریدهای با پیوندهای آنومری همسان پیشنهاد می‌شود. بطوریکه پیوند C-H آنومری تأثیری بر نوع (واحد گلوکز) و وضعیت پیوند ندارد ولی هم‌پوشانی جذب پیوندهای مشابه و مجاور هم در بسیاری از واحدهای پلی‌ساکاریدها، منجر به ایجاد ابهام در تفسیر طیف IR می‌شود (تسایبی، ۲۰۰۷؛ والتر و همکاران، ۱۹۹۸). گروه‌های عاملی و طول موج مربوط به هریک از آن‌ها در پلی‌ساکاریدها در پیوست ۵ و ۶ آمده است.

#### ۱-۶-۳-۴- طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR)

NMR روشی مناسب برای شناسایی و تجزیه و تحلیل ترکیبات آلی است. این روش بسیار مهم بر اساس اسپین مغناطیس هسته‌های اتم‌های <sup>1</sup>H، <sup>13</sup>C، <sup>15</sup>N، <sup>19</sup>F، <sup>31</sup>P و اتم‌های مشابه پایه‌گذاری شده است. علاوه بر شیمیدان‌ها، فیزیکی‌دان‌ها، بیوشیمی‌دان‌ها، شیمیدان‌های علوم دارویی، پزشکان و داروسازها نیز از دستگاه‌های NMR استفاده می‌کنند و از این روش در علوم مختلف برای توضیح اطلاعات ساختاری و خصوصیات فیزیکی یک مولکول کمک گرفته می‌شود. آزمون NMR به دلایل زیر دارای اهمیت است:

۱- در ناحیه فرکانس رادیویی کار می‌کند که برای انسان مضر نیست.

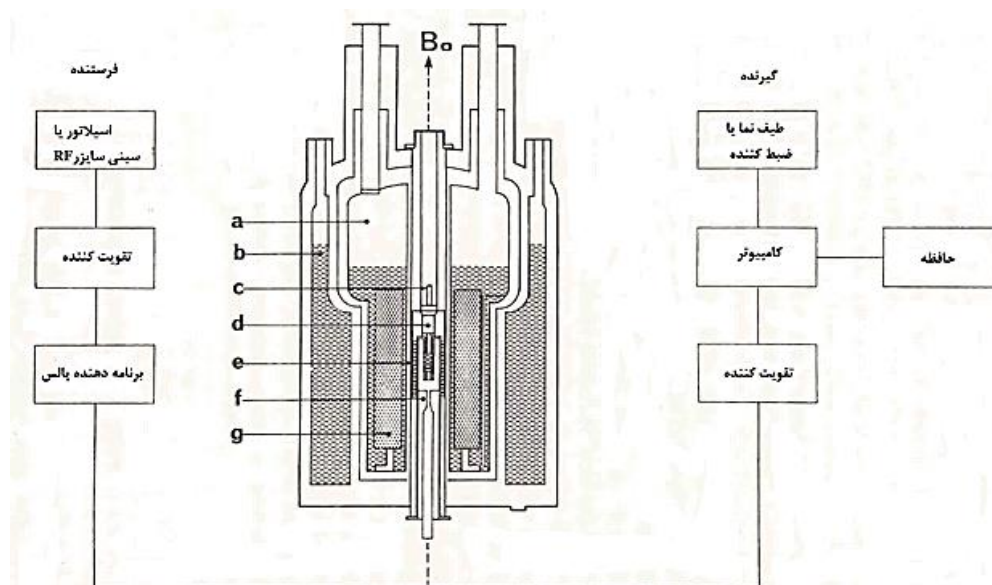
۲- می‌تواند بین بافت سخت و نرم تفاوت قائل شود.

---

<sup>۱</sup> Anomeric configuration

۳- در کنار اطلاعات ساختار موجود زنده، اطلاعات فیزیولوژیکی نیز ارائه می‌کند (بالسی، ۱۳۸۹).

در شکل ۱-۱۰ شمایی از اجزای سازنده دستگاه NMR نشان داده شده است.



(a) محفظه خنک هلیوم مایع، (b) محفظه خنک نیتروژن مایع، (c) لوله نمونه، (d) اسپینر، (e) ماریجیچ شیم،

(f) پروب، (g) آهنربا الکتریکی فوق هادی،  $B_0$  میدان مغناطیسی ساکن.

شکل ۱-۱۰: شمایی از اجزای دستگاه NMR (راتیون<sup>۱</sup>، ۱۹۸۵).

طیف NMR براساس ویژگی اسپین هسته است. زمانیکه مولکول در میدان مغناطیس قرار می‌گیرد، اسپین‌های هسته می‌توانند به صورت موازی یا غیرموازی در میدان ردیف شوند و این امر منجر به اختلاف در سطح انرژی آن‌ها می‌شود. جابه‌جایی در بین سطوح انرژی می‌تواند، انرژی را برانگیخته و یا جذب کند که به صورت سیگنال رزونانس گزارش می‌شود. طیف NMR از اندازه‌گیری داده‌های محیط شیمیایی اتم‌ها (جابه‌جایی شیمیایی<sup>۲</sup>  $(\delta)$ ، موقعیت مولکول (ثابت جفت شدن<sup>۳</sup> اسپین-اسپین  $(J)$ ) و تعداد اتم‌هایی که سیگنال می‌دهند (انترگرال) بدست می‌آید (ویدمالم<sup>۴</sup>، ۱۹۹۸). با بررسی

<sup>۱</sup> Rathbone

<sup>۲</sup> Chemical shift

<sup>۳</sup> Coupling- constant

<sup>۴</sup> Widmalm

طیف‌های  $^1\text{H}$  و  $^{13}\text{C}$  می‌توان ساختار پلی‌ساکاریدهای پیچیده را تخمین زد زیرا تفاوت زیادی بین جابه‌جایی شیمیایی سیگنال‌های  $^{13}\text{C}$  در مقایسه با سیگنال  $^1\text{H}$  وجود دارد (کاسو<sup>1</sup>، ۱۹۸۵). با پیشرفت فناوری در دهه ۱۹۸۰، پایه طیف‌سنجی NMR دو بعدی نیز شکل گرفت. در این نوع طیف، یک جابه‌جایی شیمیایی اضافی (سیستم جور هسته همچنین سیستم ناچور هسته) در محور سوم ثبت می‌شود، در نتیجه طیف سه بعدی بدست می‌آید (بالسی، ۱۳۸۹). طیف NMR اغلب به صورت یک بعدی برای تعیین هویت ترکیبات و یا اطمینان از خالص بودن ماده استفاده می‌شود و NMR دو بعدی برای شناخت کامل مولکول و بررسی ساختار و دینامیک حلقه کربوهیدرات‌ها از مونوساکارید تا پلی‌ساکارید کاربرد دارد (ویدمالم، ۱۹۹۸).

## ۷-۱- گیاه تمشک

### ۱-۷-۱- مقدمه

ایران از مناطق اصلی تنوع گیاهی جهان است و از کشورهای با ذخایر ژنتیکی مطلوب در زمینه گیاهان و به خصوص محصولات باغبانی محسوب می‌شود (قاسمی عمران و همکاران، ۱۳۹۳). موقعیت جغرافیایی خاص و برخورداری از شرایط اقلیمی مختلف در ایران، امکان پرورش انواع میوه‌ها را برای تولیدکنندگان میوه فراهم کرده و کشور ما را در زمره مهمترین مراکز تولید در آورده است. علاوه بر پرورش درختان میوه سردسیری، نیمه گرمسیری و گرمسیری در مناطق مختلف کشورمان، شرایط مناسب برای کشت و کار میوه‌های ریز از جمله انگور، توت‌فرنگی، ذغال اخته، کیوی‌فروت، تمشک و انگورفرنگی موجود است. عامل محدودکننده پرورش میوه‌های ریز مانند دیگر درختان میوه، ارتفاع از سطح دریا و عرض جغرافیایی است. تولید محصولات جانبی از میوه‌های ریز مانند آب‌میوه، ژله، مربا، کنسروهای مختلف، استفاده از میوه‌های ریز در شیرینی‌پزی و نیز استفاده از آن‌ها در تهیه وسایل بهداشتی، دارای ارزش اقتصادی برای تولیدکنندگان میوه و کشور است (جلیلی مرندی، ۱۳۸۶).

---

<sup>1</sup> Casu

با وجود اینکه از گیاهان دارویی به عنوان دارو نام برده می‌شود اما برخی از اعضای این خانواده مثل عرقیات، جایگاه تازه‌ای برای خود ایجاد کرده‌اند و در قالب نوشابه‌های گیاهی با بسته‌بندی‌های مناسب کارخانه‌های صنایع غذایی در اختیار مصرف‌کنندگان قرار می‌گیرند که در برخی موارد با استقبال خوبی روبه‌رو شده‌اند. تمشک از جمله گیاهان مستعدی است که در صورت شناسایی دقیق و خواص کاربردی آن می‌توان آینده‌ای نویدبخش برای آن در مصارف صنایع غذایی پیش‌بینی نمود. استفاده از ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و حتی بذر تمشک در قالب مصارف دارویی از گذشته‌های دور به صورت‌های مختلفی مانند دم‌نوش، پودر شده، ضماد، ماسک و غیره رایج بوده است. اخیراً بخش‌هایی از این گیاه مثل برگ تمشک در قالب دم‌نوش‌های کیسه‌ای عرضه می‌شوند. (حدادی نژاد و همکاران، ۱۳۹۳). تمشک از زمان قدیم مورد توجه بوده است. تئوفراست<sup>۱</sup> که در قرن چهارم قبل از میلاد می‌زیسته، تمشک را جزو گیاهان دارویی نام می‌برد و اشاره می‌کند که «جوشانده تمشک معده و روده را جمع می‌کند و اگر برگ‌های آن را بچونند لثه‌های دندان را محکم کرده و تقویت می‌کند و همچنین اگر برگ‌های تمشک را بکوبند و به شکل ضماد استعمال کنند زخم‌ها را التیام می‌دهد». در قرن هفتم میلادی سنت هیلدگرا<sup>۲</sup> عقیده خود را درباره تمشک این‌طور اظهار داشت «تمشک دارو و درمان کاملی بر ضد درد دندان، دهان و سینه است» (نراقی، ۱۳۸۲). ابوعلی سینا در کتاب قانون بیان می‌کند برگ یا میوه رسیده تمشک زخم دهان را شفا دهد و لثه را محکم می‌کند (حاجی آخوندی و همکاران، ۱۳۸۱). نام‌های متعدد تمشک در ایران، لم در نور، لام در شیرگاه، بورتیکان در رامیان، بلوش و ولش در تنکابن و گیلان، هَندَل در آستارا، کره تیف در لاهیجان، بورجان در ارسباران، همیشه بوز در طوالش، تمشگ در کتول، رودسر، رامسر و در بیشتر نقاط کشور، دولاتا در بجنورد، تمیش در آمل، تمش در مازندران، تورک در کردستان، توت ترک در مریوان، توت دره در درزلقی، تی دره سپید دشت لرستان، تودرک و درو در سردشت و دوری رشک در ارومیه می‌باشند. همچنین تمشک با نام‌های تلس، تموش، تموشی، تودر، توت‌شوکی، توت‌سه‌گل، توت‌الارض، تلو، لوش،

---

<sup>۱</sup> Theophraste

<sup>۲</sup> Hildgerad

گیهه‌کوهی، دردوک، فرواله، علیق، علیق‌الجبل، سه‌گل و توت‌العلیق نیز شناخته می‌شود و در زبان فرانسه به نام Ronce و به زبان انگلیسی Black-berry و Bramble گفته می‌شود (حاجی‌شریفی، ۱۳۸۹؛ خیرالدین، ۱۳۸۷). تمشک قرمز و تمشک سیاه هر دو از خانواده گل‌سرخیان<sup>۱</sup> و جنس *Rubus* هستند. تمشک قرمز از گونه *R. idaeus* و تمشک سیاه از گونه *R. occidentalis* است.

تمشک قرمز گیاهی درختچه‌ای و بدون تیغ است که از طریق پاجوش و قلمه ریشه زیاد می‌شود. شاخه‌های این گونه نیاز به قیم دارند تا به صورت عمودی قرار گیرند. تمشک قرمز برای گل‌دهی به روز کوتاه و دمای خنک (۱۳°C) نیاز دارد ولی در این دما و روز بلند گل نمی‌دهد. میوه‌های آن مخروطی شکل بوده و در طی یک دوره یک ماهه (اواخر خرداد تا اواخر تیرماه) بتدریج رسیده و بلافاصله برداشت می‌شوند. قسمت مرکزی میوه تمشک قرمز هنگام جداسازی از شاخه از آن جدا شده، لذا میوه‌ها تو خالی و گوشت آن نرم و زود فاسد می‌شود. بنابراین باید میوه‌های آن را بلافاصله پس از برداشت به انبار سرد منتقل نمود یا آن‌ها را منجمد کرد. از ارقام عمده تمشک قرمز می‌توان به کنبای<sup>۲</sup>، چیف<sup>۳</sup>، میکر<sup>۴</sup>، میلتون<sup>۵</sup> و ویلامت<sup>۶</sup> اشاره کرد (خدیوی، ۱۳۸۹؛ رسول‌زادگان، ۱۳۷۵).

تولید تمشک سیاه در پانزده تا بیست سال گذشته توسعه یافته و در این مدت به محصولی بسیار مهم بدل شده است. کشور مکزیک از اوایل تا اواسط دهه<sup>۷</sup> ۲۰۰۰، به بزرگترین مرکز تولید تمشک سیاه در جهان تبدیل شد. این تولیدات عمدتاً برای بازار تازه‌خوری و نیز صادرات به بازارهای خورده‌فروشی آمریکا و اروپا بود. با اینکه در کتب باغبانی دهه<sup>۸</sup> ۱۶۶۰ میلادی، به تمشک سیاه اشاره‌هایی شده است اما برای مردمی که در نزدیکی آن‌ها زندگی می‌کردند، کاملاً معمول و عادی بود و مردم علاقه<sup>۹</sup> زیادی به کشت و گسترش ارقام تمشک نداشتند. تا اینکه سرانجام در قرن ۱۹ میلادی گزینش‌های مستند از نژاد غیرمعمول وحشی که رنگی سفید یا صورتی داشت و به نظر غالب می‌رسید آغاز شد (کلارک<sup>۱۰</sup>).

<sup>۱</sup> Rosaceae

<sup>۲</sup> Canby

<sup>۳</sup> Chief

<sup>۴</sup> Meeker

<sup>۵</sup> Milton

<sup>۶</sup> Willamette

<sup>۷</sup> Clark

و همکاران، ۲۰۱۱). تمشک سیاه، از گیاهان میوه‌ریزی است که به دلیل وجود جمعیت‌های وحشی و طبیعی آن در سراسر کشور (به خصوص در منطقه شمال) دارای تنوع مطلوبی است (قاسمی عمران و همکاران، ۱۳۹۳). این گونه قوی‌تر از تمشک قرمز است ولی برای رسیدن و دستیابی به اندازه خوب میوه نیاز به آبیاری کافی و فراوان دارد. تمشک سیاه حتماً نیاز به قیم دارد و در صورتیکه شاخه‌ها بر روی زمین پراکنده شوند، پرورش آن‌ها بی‌فایده خواهد بود. این گونه دارای میوه‌های گرد و با دانه بیشتر است و در هنگام برداشت میوه تمشک سیاه، مغز میوه در داخل آن باقی می‌ماند. از ارقام مهم تمشک سیاه می‌توان به آلن<sup>۱</sup>، بریستول<sup>۲</sup>، دون‌دیی<sup>۳</sup>، سیلوان‌بری<sup>۴</sup>، بوی‌سن‌بری<sup>۵</sup>، لوگان‌بری<sup>۶</sup> و یانگ‌بری<sup>۷</sup> اشاره کرد (خدییوی، ۱۳۸۹؛ رسول‌زادگان، ۱۳۷۵).

#### ۱-۷-۲- خصوصیات اکولوژیکی و تاکسونومی گیاه

تمشک متعلق به تیره گل‌سرخیان و جنس تمشک است و از گیاهان چوبی چند ساله به شمار می‌آید. این گیاه به طور طبیعی در جنگل‌ها و بیشه‌زارها رشد می‌کند. پراکنش طبیعی تمشک مناطق آمریکای شمالی، اروپا و آسیا است. مناطق رشد این گیاه در ایران ارتفاعات استان گیلان، آذربایجان، خراسان، لرستان، مازندران و گرگان است. تمشک ریشه‌های متراکم دارد و شامل ریشه عمیق با رشد طولی زیاد و ریشه‌های افشان است، که رشد آن‌ها کمتر بوده و نزدیک سطح خاک قرار می‌گیرند. نفوذ ریشه‌ها تا ۱۷۵ سانتی‌متر درون خاک ادامه می‌یابد. حدود ۷۰٪ از ریشه‌ها در عمق ۲۵ سانتی‌متری، ۲۰٪ در عمق ۵۰ سانتی‌متری و حدود ۱۱٪ در عمق ۱۲۰ سانتی‌متری خاک قرار دارند. ریشه‌ها بلافاصله قبل از شروع رشد شاخه‌ها در اوایل بهار فعال می‌شوند و تا اواخر پاییز به رشد خود ادامه می‌دهند. بیشترین سرعت رشد شاخه‌ها در اواسط تابستان و در صورت وجود آب کافی است. در زمستان، جوانه‌های رویشی موجود بر روی ریشه‌ها، مانند جوانه‌های شاخه‌ها دوره رکود را سپری

---

<sup>۱</sup> Allen

<sup>۲</sup> Bristol

<sup>۳</sup> Dundee

<sup>۴</sup> Silvan berry

<sup>۵</sup> Boysen berry

<sup>۶</sup> Logan berry

<sup>۷</sup> Young berry

می‌کنند و در اوایل بهار فعال می‌شوند. میوه‌های تمشک نافرازگرا<sup>۱</sup> هستند بطوریکه هنگام رسیدن فاقد بیشینه<sup>۲</sup> تنفسی بوده و اتیلن کمتری تولید می‌کنند. عمر اقتصادی بوته‌های تمشک ۲۵-۳۰ سال و میزان عملکرد تمشک‌های قرمز و سیاه به ترتیب ۱۶ تن در هکتار و ۱۳ تن در هکتار است (جلیلی مرندی، ۱۳۸۶). جنس تمشک در ایران ۸ گونه گیاه علفی و درختچه‌ای غالباً تیغ‌دار با نام عمومی تمشک دارد که در مناطق جنگلی و غیرجنگلی و غالباً در سایه می‌رویند. گونه‌های برگ نارونی یا درختچه‌ای، کبود<sup>۲</sup>، خرزی یا ولوش<sup>۳</sup>، لاهیجانی<sup>۴</sup>، جنگلی یا کرک‌آلود<sup>۵</sup>، قفقازی<sup>۶</sup>، ایرانی<sup>۷</sup>، تالشی یا هندل<sup>۸</sup> و سنگی<sup>۹</sup> در ایران می‌رویند. گونه‌های خرزی، قفقازی، ایرانی و تالشی علاوه بر ایران در روسیه، طالش و قفقاز نیز رشد دارند (مظفریان، ۱۳۸۸).

### ۱-۷-۳- موارد مصرف و کاربرد تمشک

برگ و جوانه‌های این درختچه‌ها و همچنین گل و ریشه آن‌ها، بطور ملایم، اثر قابض، بندآورنده<sup>۱</sup> خون، ضد دیابت، مقوی و تصفیه‌کننده خون دارند. از برگ آن‌ها برای رفع اسهال‌های ساده، اخلاط خونی، وجود خون در ادرار، درمان دیابت، کم‌خونی، گرفتگی صدا و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود. در استعمال بیرونی، از جوشانده برگ آن‌ها به صورت غرغره برای رفع گلو درد، ورم لوزه‌ها، ورم لثه‌ها و ورم حلق و حنجره می‌توان استفاده کرد. مصرف جوشانده پوست ریشه این درختچه به صورت شست‌وشو و تزریق برای درمان بیماری‌های زنانه مفید است (خضری، ۱۳۸۱). از میوه تمشک به طور سنتی برای درمان سوءهاضمه و روماتیسم استفاده می‌شود. عصاره<sup>۲</sup> آن در طب سنتی به عنوان خنک‌کننده برای درمان تب، بیماری‌های دوران کودکی و التهاب مثانه به کار می‌رود (حاجی‌آخوندی و همکاران، ۱۳۸۱). شیر<sup>۳</sup> برگ‌ها و ریشه<sup>۴</sup> آن به شکل عصاره و یا چای از جانب مردم

---

<sup>۱</sup> Non climacteric

<sup>۲</sup> *R. caesius*

<sup>۳</sup> *R. hyrcanus*

<sup>۴</sup> *R. lahidjanensis*

<sup>۵</sup> *R. lanuginosus*

<sup>۶</sup> *R. ochthodes*

<sup>۷</sup> *R. persicus*

<sup>۸</sup> *R. raddeanus*

<sup>۹</sup> *R. saxatilis*



برای درمان بیماری‌های زخم معده، گاستریت مزمن و سنگ کلیه به شکل گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. بطوریکه برای درمان استوماتیت (التهاب لایه مخاطی دهان)، آنژین و گلودرد این عصاره را غرغره می‌کنند (نورعلی‌یف و همکاران، ۱۳۹۰).

#### ۱-۷-۴- تمشک برگ نارونی

تمشک برگ نارونی یا درختچه‌ای، درختچه‌هایی به ارتفاع ۱-۲ متر، پر ساقه و انبوه، سبز متمایل به خاکستری، با ساقه‌های متعدد و پرشاخه و شاخه‌های خیزان ایستاده، با سطح دارای زاویه و شیاردار است. خارهای آن محکم، قوی، طویل و غالباً برگشته هستند. برگ‌های تمشک درختچه‌ای دارای ۳-۵ برگچه، چرمی، در رو دارای کرک‌های ستاره‌ای، خزی-کرکینه‌پوش و در پشت کرکینه‌پوش و سفید رنگ است. برگ‌ها در حاشیه دارای دندان‌هایی ساده یا مضاعف اره‌ای، با قاعده مدور یا قلبی شکل هستند. برگچه‌های انتهایی نیمه مدور یا تخم‌مرغی‌اند و در انتها دارای نوکچه هستند. برگچه‌های جانبی کم و بیش هم شکل و بدون دم‌برگند، گوشوارک برگ‌ها خطی و باریک یا نازک و نخ‌نی است. گل‌های آن به رنگ صورتی یا ارغوانی رنگ پریده است، گل‌ها در آذین منشعب و بسیار بزرگ، با انشعابات ثانوی کم و بیش گسترده جمع شده‌اند. کاسبرگ‌ها تخم‌مرغی-پهن درازند و بسیار کوتاه‌تر از گلبرگ‌ها و در هر دو رو کرک‌پوش هستند (گلبرگ‌ها در سطح خارجی کرکینه‌پوش و بساک پرچم‌ها پوشیده از کرک‌های بلند است). میوه تمشک برگ نارونی کروی، با برچه‌های گوشتی و آبدار، ابتدا قرمز و سپس سیاه رنگ است (شکل ۱-۱۱). موسم گل‌دهی این گونه تمشک اردیبهشت-خرداد ماه است. انتشار جغرافیایی تمشک برگ نارونی در ایران به شرح زیر است:

استان گلستان: بین نوده و گرگان، گرگان، بندر گز، تپه مراوه. استان مازندران: کجور، دشت‌نظیر، نوشهر، دره رودخانه چالوس. استان گیلان: آستارا، بندر انزلی. استان کردستان: سنندج، بین سنندج و محمدآباد، آرومان. استان لرستان: قمشید، بین خرم‌آباد و اندیمشک، تنگ پنج، بیشه، خرم‌آباد. استان کرمانشاه: قصرشیرین. استان خوزستان: هفت‌تپه، بختیاری، لاب سفید. استان فارس: حسین‌آباد شیراز، دشت‌ارژن، سیواند، خانه زینان، رودمند، سفیدرود نزدیک شاهپور، بین کوه دینار و سی‌سخت،

بین تل خسروی و سی سخت. استان خراسان: کاشمر. استان تهران: دربند، پس قلعه، شمیران، دماوند و همچنین در شهرستان‌های کرج، قزوین و بیلغان رشد می‌کند (قهرمان، ۱۳۷۸).



شکل ۱-۱۱: میوه، ساقه، گل و برگ‌های تمشک برگ نارونی (قهرمان، ۱۳۷۸).

زیستگاه تمشک برگ نارونی علاوه بر کشور ایران، غرب آسیا، شمال غرب ارتفاعات هیمالیا، کشمیر، چیترال، پاکستان، افغانستان، ترکمنستان، قفقاز و شبه جزیره بالکان است (عبدالله<sup>۱</sup> و همکاران، ۱۹۸۲).

<sup>۱</sup> Abdallah

## ۱-۷-۵- ترکیبات شیمیایی جنس تمشک و گونه تمشک برگ نارونی

قسمت‌های مختلف این درختچه‌ها دارای ترکیبات شیمیایی به شرح زیر هستند: برگ‌ها دارای مواد آل‌بومینوئیدی فراوان و تانن هستند. میوه تمشک به طور متوسط دارای ۸۵٪ آب، ۴ تا ۷٪ مواد قندی (دکستروز، لولز، به مقدار بسیار جزئی ساکارز)، مقدار کمی از اسیدهای آلی مختلف مانند اسید سوکسینیک، اسید مالیک، اسید اگزالیک، اسید سیتریک و اسید سالیسیلیک، به مقدار کم اینوزیت، صمغ، پکتین، کمی مواد چرب و پنتوزان است. قسمتی که درون برچه‌های آبدار و رسیده قرار دارد، شامل ۱۳٪ روغن مرکب از اولئین و لینولئین است (خضری، ۱۳۸۱). تمشک برگ نارونی نیز منبع قابل توجهی از ترکیب‌های فنولی شامل آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها، اسید کلروژنیک، فلاونوئیدها، تانن‌ها و پروسیانیدین‌ها با فعالیت بیولوژیکی بالا است و بدن را در برابر بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، التهاب‌ها، چاقی و دیگر بیماری‌های مزمن حفاظت می‌کند (قربانلی و همکاران، ۱۳۹۱). تحقیقات انجام شده بر روی برگ، گل و میوه تمشک برگ نارونی نشان داده است که برگ تمشک برگ نارونی حاوی کوئرستین-۳-روتینوزید<sup>۱</sup>، کوئرستین-۳-گلوکوزید<sup>۲</sup>، اسید کالیک<sup>۳</sup>، اسید الاجیک<sup>۴</sup> و اسید کلروژنیک است درحالی‌که میوه<sup>۵</sup> آن غنی از آنتوسیانین و به خصوص سیانیدین-۳-گلوکوزید<sup>۵</sup> است و دارای اسید گالیک<sup>۶</sup> و اسید الاجیک می‌باشد. میوه و برگ تمشک برگ نارونی کمترین مقدار کاتکین<sup>۷</sup> و لئوکوآنتوسیانین<sup>۸</sup> را دارند و ترکیب فنلی غالب آن‌ها، پیگمان‌های آنتوسیانین است (دیاسامیدز<sup>۹</sup> و همکاران، ۲۰۱۳). محتوی قندهای محلول، مواد جامد محلول<sup>۱۰</sup>، ترکیبات فنلی شامل فنل کل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین در تمشک برگ نارونی رسیده بیشتر از تمشک نارس آن است که این امر نشان‌دهنده اثر بلوغ بر ترکیبات سازنده میوه این گونه تمشک است. همچنین نتایج تحقیقات حاکی از

<sup>۱</sup> Quercetin-3-rutinoside

<sup>۲</sup> Quercetin-3-glucoside

<sup>۳</sup> Callic acid

<sup>۴</sup> Ellagic acid

<sup>۵</sup> Cyanidin-3-glucoside

<sup>۶</sup> Gallic acid

<sup>۷</sup> Catechin

<sup>۸</sup> Leucoanthocyanin

<sup>۹</sup> Diasamidze

<sup>۱۰</sup> Total soluble solids (TSS)

آن است که میزان پتاسیم در میوه تمشک برگ نارونی، نسبت به سدیم، کلسیم و منیزیم آن بیشتر است (رضایی کیوی و همکاران، ۲۰۱۳؛ قربانلی و همکاران، ۱۳۹۱؛ لیوانی و همکاران، ۱۳۹۲ و ۲۰۱۳).

# فصل دوم:

## بررسی منابع

## ۲-۱- استخراج و خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها

ایزومرهای زیادی برای قندهای پنتوز و هگزوز وجود دارد که حضور تعداد کمی از آن‌ها در ساختار یک پلی‌ساکارید بخصوص محتمل است. از سوی دیگر پلی‌ساکاریدهای زیادی به علت تنوع در نوع واحدهای سازنده و نیز پیوند بین آن‌ها، در طبیعت وجود دارد لذا تمایز در ساختار پلی‌ساکاریدها منجر به ایجاد روش‌های جداسازی متنوع شده است (پازور، ۱۹۹۴). در ادامه مطالب به طور مختصر برخی از روش‌های جداسازی پلی‌ساکاریدهای طبیعی که توسط محققان در سال‌های اخیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند بیان شده است.

ژنگ<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۶ موفق به استخراج پلی‌ساکارید کم وزن از گل *Abelmoschus manihot*<sup>۲</sup> توسط آب (۸۰°C) شدند. خالص‌سازی این پلی‌ساکارید با استفاده از ستون‌های دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز ۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۶).

پلی‌ساکاریدهای ریشه‌های آنجلیکا سیننسیس<sup>۳</sup> و گون ممبراناسیوس<sup>۴</sup> توسط پو<sup>۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۶، به روش استخراج با آب جوش جداسازی شدند. خالص‌سازی مقدماتی با استفاده از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز ۵۲ و فازهای متحرک آب، سود ۰/۱ نرمال و سود ۰/۳ نرمال انجام شد. خالص‌سازی نهایی بر روی پلی‌ساکاریدهای اسیدی غالب حاصله توسط ستون سفادکس جی-۱۰۰ و کروماتوگرافی طردی صورت گرفت (پو و همکاران، ۲۰۱۶).

زو<sup>۶</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۶ از ریزوم‌های *Atractylodes chinensis*<sup>۷</sup>، پلی‌ساکارید فروکتان را بوسیله آنزیم و روش کمکی فراصوت جداسازی کردند و با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یون و ستون حاوی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سفارز جریان سریع و کروماتوگرافی ژل تراوا (ستون حاوی سفادکس جی-۱۵۰) خالص‌سازی کردند (زو و همکاران، ۲۰۱۶).

---

<sup>۱</sup> Zheng

<sup>۲</sup> *Abelmoschus manihot*

<sup>۳</sup> *Angelica sinensis*

<sup>۴</sup> *Astragalus membranaceus*

<sup>۵</sup> Pu

<sup>۶</sup> Xu

<sup>۷</sup> *Atractylodes chinensis*

وانگ<sup>۱</sup> و همکاران پلی ساکارید محلول در آب گیاه پوریا کوکوس وُلف<sup>۲</sup> را در سال ۲۰۱۶ مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها جهت استخراج از چهار روش فراصوت، ماکروویو، آنزیمی و آب جوش استفاده کردند و ویژگی‌های هر کدام از روش‌ها را با یکدیگر مقایسه نمودند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۶).

دو هتروپلی ساکارید از قارچ خوراکی پلئوروتوس اِرنجی<sup>۳</sup> توسط رِن<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۶، طی سه مرحله استخراج با آب ۸۰°C و ترسیب با اتانل بدست آمد (رِن و همکاران، ۲۰۱۶).

هو<sup>۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی ساکارید همگنی را از ساقه‌های گیاه آکانتوپاناکس براچیپوس<sup>۶</sup> با آب ۸۰°C جداسازی کردند. خالص‌سازی پلی ساکارید با استفاده از ستون‌های دی‌اتیل آمینواتیل-سلولز ۵۲، سفاکریل‌اس-۳۰۰ اِچ‌آر و کروماتوگرافی ژل تراوا انجام شد (هو و همکاران، ۲۰۱۵).

از ریشه‌های نانوکی رونده<sup>۷</sup> سه پلی ساکارید اسیدی جدید توسط جیا<sup>۸</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۵ بوسیله آب ۷۰°C استخراج شد. خالص‌سازی پلی ساکارید با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل آمینواتیل-سلولز ۵۲ و سفادکس جی-۱۵۰ صورت گرفت (جیا و همکاران، ۲۰۱۵).

لی<sup>۹</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۵، پلی ساکارید محلول در آب صدف خوراکی اُستریا ریولاریس<sup>۱۰</sup> را به روش آنزیمی استخراج کردند و با کمک ستون‌های دی‌اتیل آمینواتیل-سلولز ۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ خالص‌سازی آن را انجام دادند (لی و همکاران، ۲۰۱۵).

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی حاصل از گیاه آلیوم ماکروستمون<sup>۱۱</sup> (نوعی پیاز) را توسط آب ۸۷°C استخراج کردند و پس از خالص‌سازی با ستون‌های دی‌اتیل آمینواتیل

---

<sup>۱</sup> Wang

<sup>۲</sup> *Poria cocos* Wolf

<sup>۳</sup> *Pleurotus eryngii*

<sup>۴</sup> Ren

<sup>۵</sup> Hu

<sup>۶</sup> *Acanthopanax brachypus*

<sup>۷</sup> *Rhynchosia minima*

<sup>۸</sup> Jia

<sup>۹</sup> Li

<sup>۱۰</sup> *Ostrea rivularis*

<sup>۱۱</sup> *Allium macrostemon* Bunge

سلولز ۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰، از نظر نوع مونوساکاریدهای سازنده و نوع پیوندهای گلیکوزیدی با یکدیگر مورد مقایسه قرار دادند (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۵).

استحصال چهار هتروپلی ساکارید از دانه‌های پلنتاگو دپرسا<sup>۱</sup> (نوعی بارهنگ) توسط زائو<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴، به روش استخراج با آب (C ° ۱۰۰) انجام گرفت. خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها با کمک ستون‌های دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز ۵۲ و سفاکریل‌اس-۴۰۰ انجام شد (زائو و همکاران، ۲۰۱۴). استخراج سه نوع پلی‌ساکارید از ریشه‌های گیاه لیمونیوم سیننسه<sup>۳</sup> (یک گونه گل شصت عروسان) توسط تانگ<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ به روش استخراج با آب C ° ۹۵ گزارش شد. این محققین پلی‌ساکاریدهای مذکور را با استفاده از ستون‌های دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز ۵۲ و سفادکس جی-۱۰۰ خالص‌سازی کردند (تانگ و همکاران، ۲۰۱۴).

لیانگ<sup>۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ پلی‌ساکارید محلول در آب گل‌های چریسانتیموم موریفولیوم<sup>۶</sup> (گل داودی) را توسط آب جوش استخراج و با ستون‌های دی‌اتیل‌آمینواتیل-سفارز جریان سریع و سفادکس جی-۱۰۰ خالص‌سازی کردند (لیانگ و همکاران، ۲۰۱۴).

وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ توانستند پلی‌ساکارید محلول در آب حاوی ۳/۷۵٪ پروتئین را از میوه<sup>۷</sup> لیسیموم بارباروم<sup>۷</sup> (گونه‌ای دیوخار) را با آب گرم استخراج و به روش کروماتوگرافی ژل تراوا و ستون سفادکس جی-۱۰۰ خالص‌سازی کنند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۴).

تیان<sup>۸</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۲ پلی‌ساکارید محلول در آب گل‌های لونیکرا جاپونیکا<sup>۹</sup> (پلاخور) را با استفاده از آب C ° ۱۰۰ استخراج کردند و برای خالص‌سازی آن از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل-آمینواتیل سلولز و سفاکریل‌اس-۳۰۰ استفاده نمودند (تیان و همکاران، ۲۰۱۲).

---

<sup>۱</sup> *Plantago depressa*

<sup>۲</sup> Zhao

<sup>۳</sup> *Limonium sinense*

<sup>۴</sup> Tang

<sup>۵</sup> Liang

<sup>۶</sup> *Chrysanthemum morifolium*

<sup>۷</sup> *Lycium barbarum L.*

<sup>۸</sup> Tian

<sup>۹</sup> *Lonicera japonica*



لی و همکاران در سال ۲۰۰۹ پلی ساکارید محلول در آب دانه‌های کراتاگوس پیناتیفیدا<sup>۱</sup> (زالزالک شانه‌ای) را به کمک آب جوش و آنزیم پکتیناز جداسازی کردند و توسط ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل-سفارز CL-6B خالص‌سازی آن را انجام دادند (لی و همکاران، ۲۰۰۹).

علی‌رغم مطالعات گسترده صورت گرفته بر روی گیاه تمشک، بررسی کمی بر روی پلی ساکاریدهای آن انجام شده است. کارتیر و همکاران در سال‌های ۱۹۸۷ و ۱۹۸۸ سلول‌های خارجی دیواره سلولی تمشک فراتیکوسوس را کشت و پلی ساکاریدهای آن را بررسی کردند. خالص‌سازی پلی ساکارید استحصال‌ی توسط محققین نامبرده با استفاده از هیدروکسید باریم انجام شد (کارتیر و همکاران، ۱۹۸۷-۱۹۸۸).

نی و همکاران در سال ۲۰۰۹ پلی ساکارید ریشه‌های تمشک کراتاجیفولیوس را با آب جوش (C ° ۱۰۰) جداسازی و با ستون کروماتوگرافی سفارز CL-6B خالص‌سازی کردند (نی و همکاران، ۲۰۰۹). یو و همکاران در سال ۲۰۱۵، پلی ساکارید محلول در آب میوه تمشک آیدیئوس را به روش آنزیمی استخراج و با استفاده از رزین‌های درشت (RCP) D4020 و ستون سفادکس جی-۱۰۰ (RCP-I) و (RCP-II) خالص‌سازی کردند، راندمان استخراج RCP-I، RCP-II و RCP-II به ترتیب ۲۶٪، ۰/۰۸٪ و ۴۱٪ بود (یو و همکاران، ۲۰۱۵).

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی ساکارید میوه و برگ تمشک چینجی‌هو را با آب C ° ۱۰۰ استخراج کردند. حذف پروتئین‌ها به روش سواگ انجام شد و مقایسه خواص ضد اکسندگی و ضد سرطانی این دو پلی ساکارید مورد بررسی قرار گرفت. پلی ساکارید ناخالص حاصل از میوه و برگ با ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل-سفارز جریان سریع و شوینده‌های آب مقطر و NaCl ۰/۱ تا ۰/۵ نرمال خالص‌سازی شدند. پلی ساکارید حاصل از میوه چهار فراکشن داشت که بیشترین مقدار (۶۸/۳٪) از شست‌وشو با سود ۰/۳ نرمال بدست آمد. در اثر خالص‌سازی پلی ساکارید حاصل از برگ سه فراکشن ایجاد شد که بیشترین (۴۸٪) آن‌ها از شست‌وشو با آب مقطر حاصل شد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۵).

<sup>۱</sup> *Crataegus pinnatifida* Bge

## ۲-۲- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، شناسایی ساختار پلی ساکاریدها به علت وجود ارتباط بین ساختار و خواص فیزیکی و شیمیایی و نیز زیستی آن‌ها مورد توجه پژوهشگران زیادی است و چاپ گسترده مقالات پژوهشی مرتبط با ساختار، گواهی بر این ادعا است.

مورنو<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۶ ساختار گلوکان قارچ خوراکی کوکینا تری کولوما<sup>۲</sup> را شناسایی کردند. زنجیر اصلی این پلی ساکارید از واحدهای گلوکز با پیوند بتا ۱ به ۳ تشکیل شده بود که شاخه تک واحدی گلوکز از طریق پیوند بتا ۱ به ۶ به آن اتصال داشت (مورنو و همکاران، ۲۰۱۶).

ژانگ و همکاران، با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی، NMR و آنالیز متیلاسیون، ساختار پلی ساکارید استخراج شده از رادیکس پائونیا آلبا<sup>۳</sup> را تعیین کردند. بررسی‌های آن‌ها نشان داد که زنجیر اصلی پلی ساکارید حاوی واحدهای گلوکز با پیوند آلفا ۱ به ۴ است که از محل کربن شماره ۶ شاخه‌دار می‌شود. نتایج آزمون‌ها همچنین نشان داد که پلی ساکارید حاوی پروتئین و اسید اورونیک است (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۶).

کویی و همکاران در سال ۲۰۱۵ چهار فراکشن از پلی ساکارید خالص حاصل از میوه زردآلو (آرمنیکا سیبیریکا<sup>۴</sup>) بدست آوردند و ساختار فراکشن اول را آنالیز کردند. نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که پلی ساکارید مذکور از رامنوز، گلوکز، مانوز و گالاکتوز به نسبت‌های به ترتیب ۱/۳۴، ۲/۰۱، ۰/۴۸ و ۰/۳۵ تشکیل شده است. زنجیر اصلی حاوی رامنوز و گلوکز است و شاخه‌ها از مانوز و گالاکتوز تشکیل شده‌اند. طیف <sup>1</sup>H-NMR موقعیت آلفا را برای واحدهای پلی ساکارید مذکور نشان داد (کویی و همکاران، ۲۰۱۵).

<sup>۱</sup> Moreno

<sup>۲</sup> *Cookeina tricholoma*

<sup>۳</sup> *Radix paeoniae Alba*

<sup>۴</sup> *Armeniaca sibirica* L. Lam

گلوکان جدیدی با زنجیر اصلی آلفا ۱ به ۴ و شاخه فرعی (به فاصله هر چهار گلوکز یکبار) از محل کربن شماره ۶، از سلول‌های خارجی باکتری لاکتوباسیلوس رئوتری<sup>۱</sup>، توسط میائو<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ شناسایی شد. این نتایج با کمک طیف‌سنجی NMR و GC-MS بدست آمد. وزن مولکولی پلی‌ساکارید  $10^7 \times 4/31$  گرم بر مول محاسبه شد (میائو و همکاران، ۲۰۱۴).

مطالعه پلی‌ساکارید محلول در آب حاصل از صدف خوراکی پلئوروتوس سیتروپیلِتوس<sup>۳</sup> توسط لیو<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که پلی‌ساکارید فقط از گلوکز تشکیل شده است. وزن مولکولی گلوکان استحصالی ۴۵ کیلودالتون بود و ساختار آن به روش هیدرولیز اسیدی، اکسیداسیون اسمیت و پریدات، متیلاسیون و آنالیزهای دستگاهی FTIR، GC-MS و NMR شناسایی شد. نتایج حاصل از این آزمون‌ها نشان می‌دهند که زنجیر اصلی این گلوکان، گلوکوپیرانوز با پیوندهای بتا ۱ به ۶ است که در محل کربن ۳ به یک گلوکوپیرانوز دیگر متصل شده است (لیو و همکاران، ۲۰۱۲).

شی<sup>۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ریشه گیاه هدیسروم پلی‌بوتریس هند-مز<sup>۶</sup> (یک گونه از اسپرسی) حاوی گلوکان سولفات‌ه محلول در آب است. وزن مولکولی گلوکان ۱۷۲ کیلودالتون تخمین زده شد. نتایج هیدرولیز ناقص اسیدی، متیلاسیون، GC-MS، FT-IR، NMR، طیف‌سنجی <sup>1</sup>H و <sup>13</sup>C و طیف‌های NMR دو بعدی نشان داد که گلوکان حاوی اتصالات آلفا ۱ به ۴ است که از محل کربن شماره ۶ در برخی نقاط شاخه‌دار شده و بعد از هر هشت واحد یک انتهای غیراحیاکننده قرار گرفته است. احتمال داده می‌شود که گروه سولفات در محل اتصال شاخه به کربن شماره ۶ (هر ۳۸ واحد گلوکز یکبار) به گلوکان متصل شده باشد (شی و همکاران، ۲۰۱۲).

تحقیقات کویی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که گلوکان محلول در آب حاصل از ریشه‌های پیوراریا لوباتا<sup>۷</sup> به صورت خطی است. این پلی‌ساکارید از واحدهای گلوکوپیرانوز با اتصالات آلفا ۱ به ۶

<sup>۱</sup> *Lactobacillus reuteri* SK24.003

<sup>۲</sup> Miao

<sup>۳</sup> *Pleurotus citrinopileatus*

<sup>۴</sup> Liu

<sup>۵</sup> Shi

<sup>۶</sup> *Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz

<sup>۷</sup> *Pueraria lobata*

تشکیل شده و برای شناسایی ساختار آن از آزمون‌های GC، GC-MS، طیف‌سنجی IR و NMR دو بعدی استفاده شد (کوبی و همکاران، ۲۰۰۸).

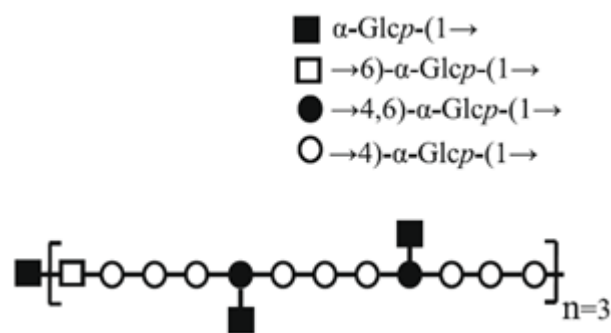
شناسایی ساختار پلی‌ساکارید حاصل از ریشه‌های اکونیتوم کارمیچالی<sup>۱</sup> (نوعی آقونیطون) با کمک آزمون‌های FT-IR، HPLC، NMR، متیلاسیون و GLC-MS توسط زائو و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت. داده‌های حاصل از آنالیزها نشان دادند که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید از واحدهای گلوکز با پیوندهای آلفا ۱ به ۶ تشکیل شده است و وزن مولکولی معادل ۱۴ کیلودالتون دارد. این گلوکان بسیار طویل و پرشاخه است و به ازای هر چهار واحد گلوکز، یک شاخه حاوی یک واحد گلوکز بر روی کربن شماره ۳ دارد (زائو و همکاران، ۲۰۰۶).

مطالعه ساختار پلی‌ساکارید سلول‌های بیرونی تمشک فراتیکوسوس توسط کارتیر و همکاران در سال ۱۹۸۷ نشان داد که این پلی‌ساکارید حاوی واحدهای آرابینوز، رامنوز و گالاکتوز و همچنین ۶/۵٪ پروتئین و ۲/۵٪ اسید اورونیک است. زنجیر اصلی آن، از واحدهای آرابینوگالاکتان با پیوندهای بتا ۱ به ۳ تشکیل شده و تعداد زیادی شاخه متشکل از واحدهای گالاکتوپیرانوز با پیوند بتا ۱ به ۶ در طول زنجیر دارد. این داده‌ها از طریق هیدرولیز انتخابی، اکسایش اسمیت، متیلاسیون، GLC-MS و طیف‌سنجی NMR بدست آمدند (کارتیر و همکاران، ۱۹۸۷). همچنین محققین نامبرده در سال ۱۹۸۸ مجدداً موفق به جداسازی و خالص‌سازی، نوعی گالاکتوگلوکومانان از دیواره‌های اولیه سوسپانسیون تمشک فراتیکوسوس و بخشی از پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی آن شدند. نسبت گالاکتوز، گلوکز و مانوز در این بیوپلیمر به ترتیب ۱۷، ۲۴ و ۲۰ بود. براساس تجزیه متیلاسیون و داده‌های C-NMR مشخص شد که دو نوع گالاکتوگلوکومانان وجود دارد که شاخه اصلی آن‌ها از پیوندهای بتا ۱ به ۴ گلوکز و مانوز تشکیل شده و حدود ۷۵٪ مانوزها از محل کربن شماره ۶ منشعب شده و سهم گلوکز در ایجاد شاخه بسیار کم است (کارتیر و همکاران، ۱۹۸۸).

---

<sup>۱</sup> *Aconitum carmichaeli* Debx

نی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که گلوکان محلول در آب حاصل از ریشه‌های تمشک کراتاجیفلویوس وزن مولکولی حدود ۷ کیلودالتون دارد. نتایج آنالیزهای FT-IR، NMR، متیلاسیون و اکسیداسیون پریدات نشان داد که پلی‌ساکارید استحصال شده یک آلفا-گلوکان متشکل از واحدهای گلوکوپیرانوز با پیوندهای ۱ به ۴ در زنجیر اصلی است و به ازای هر سه واحد گلوکز، یک شاخه جانبی متشکل از یک واحد گلوکز به کربن شماره ۶ گلوکزهای زنجیر اصلی متصل است (شکل ۲-۱) (نی و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۲-۱: ساختار پلی‌ساکارید ریشه تمشک کراتاجیفلویوس.

یو و همکاران در سال ۲۰۱۵ هتروپلی‌ساکارید اسیدی حاصل از میوه تمشک آیدیئوس را بررسی و نشان دادند که از واحدهای اسید گالاکتورونیک، رامنوز، آرابینوز، زایلوز، گلوکز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱/۰۰، ۰/۵۵، ۱/۱۹، ۰/۵۲، ۰/۴۴ و ۱/۹۰ تشکیل شده است. وزن مولکولی پلی-ساکارید حدود ۴۰۱۳ دالتون گزارش شد (یو و همکاران، ۲۰۱۵).

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی‌ساکارید خالص حاصل از میوه و برگ تمشک چینجی‌هو را مورد بررسی و مقایسه قرار دادند. در ادامه نتایج حاصل از آزمون‌های هریک جداگانه آورده شده است.

پلی‌ساکارید حاصل از میوه تمشک چینجی‌هو حاوی ۷۴/۶۳٪ قند، ۵/۸۰٪ پروتئین و ۱۲/۸۶٪ اسید اورونیک بود. وزن مولکولی پلی‌ساکارید فراکشن سوم حاصل از میوه توسط HPGP، ۸۱ کیلودالتون تخمین زده شد. رامنوز، آرابینوز، زایلوز، گلوکز و گالاکتوز به نسبت‌های مولی به ترتیب ۴/۲۱، ۱۴/۷۲، ۱/۶۳ و ۳/۲۲ واحدهای سازنده پلی‌ساکارید میوه تمشک چینجی‌هو را تشکیل دادند و آرابینوز

بیشترین مقدار (۰/۵۹/۴) و گلوکز کمترین مقدار (۰/۴/۰۴) را داشتند. پلی‌ساکارید حاصل از برگ تمشک چینجی‌هو حاوی ۰/۷۰/۰۵ قند، ۰/۷/۴۲ پروتئین و ۰/۱۶/۴۱ اسید اورونیک بود. وزن مولکولی پلی‌ساکارید فراکشن اول حاصل از برگ توسط HPGP، ۱۷ کیلودالتون تخمین زده شد. رامنوز، آرابینوز، زایلوز، گلوکز و گالاکتوز با نسبت مولی به ترتیب ۲/۴۷، ۴/۷۵، ۴/۱۲، ۱ و ۲/۴۸ واحدهای سازنده پلی‌ساکارید برگ تمشک چینجی‌هو بودند. آرابینوز (۰/۳۲/۰۵) و زایلوز (۰/۲۷/۵۰) بیشترین مقدار و گلوکز (۰/۶/۷۴) کمترین مقدار را در پلی‌ساکارید داشتند (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۵).

# فصل سوم:

## مواد و روش‌ها

### ۳-۱- مواد اولیه و محلول‌های شیمیایی

#### ۳-۱-۱- جمع‌آوری نمونه

اندام‌های هوایی گیاه تمشک در اردیبهشت ماه ۱۳۹۴ از منطقه دره توت شهرستان کرج جمع‌آوری شد و در تماس با هوا خشک شدند (شکل ۳-۱). پس از شناسایی گونه تمشک برگ نارونی توسط گیاه‌شناس معروف آقای دکتر ولی‌الله مظفریان ریشه‌های آن با قطر حدود ۱-۴ سانتی‌متر جمع‌آوری و در تماس با هوا در دمای محیط خشک شدند. در ادامه خاک و سایر آلودگی‌ها جدا و پوسته رویی ریشه‌ها کنده شد و ریشه‌های سفید و جوان از ریشه‌های مسن و تیره تفکیک شدند (شکل ۳-۲). سپس ریشه‌ها به تکه‌هایی با اندازه ۱-۰/۵ سانتی‌متر برش خوردند (شکل ۳-۳). بعلت قطور بودن ریشه‌ها و برای استخراج راحت‌تر و سریع‌تر، ریشه‌ها توسط ساطور به شکل پرک درآورده شدند (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۱: ریشه‌های گیاه تمشک برگ نارونی در خاک (سمت راست). شکل ۳-۲: ریشه‌های تمیز شده (سمت چپ).



شکل ۳-۳: ریشه‌های برش خورده.





شکل ۳-۴: ریشه‌های پرک شده.

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

دی‌اتیل‌آمینواتیل‌سلولوز، سفادکس جی-۱۵ و جی-۱۰۰، دکستران با وزن‌های مولکولی ۵۰۰۰-۲۰۰/۰۰۰ دالتون از شرکت فارماسیا<sup>۱</sup> (اُپسالا<sup>۲</sup>) سوئد تهیه شدند. استاندارد مونوساکاریدهای خالص (د-مانوز، د-گلوکز، د-گالاکتوز، د-زایلوز، د-اسید گلوکورونیک، ال-رامنوز، ال-آرابینوز، ال-اسید گالاکتورونیک)، DMSO و DSS<sup>۳</sup> از شرکت‌های سیگمای<sup>۴</sup> آمریکا و مرک<sup>۵</sup> آلمان خریداری شدند. اسید تری‌فلورواستیک از شرکت فلوکا<sup>۶</sup> تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد نیاز (مانند انواع اسیدها، بازها و غیره) درجه خلوص آزمایشگاهی داشتند. کل محلول‌های آبی مورد نیاز با استفاده از آب مقطر تهیه شدند.

### ۳-۱-۳- دستگاه‌های مورد استفاده

دستگاه سانتریفیوژ با ظرفیت حجمی بالا (۱ لیتر) ساخت شرکت اپندورف<sup>۷</sup> آلمان و ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم ساخت شرکت ای‌اند دی<sup>۸</sup> ژاپن و هیتر ترمو<sup>۹</sup> مدل‌ای‌ام ۵۰۰۰-سی‌ای<sup>۱۰</sup> ساخت کشور انگلستان استفاده شد. دستگاه‌های پلاریمتر پرکین‌المر<sup>۱۱</sup> ۳۴۳، اسپکتروفوتومتر واریان کری-

<sup>۱</sup> Pharmacia

<sup>۲</sup> Uppsala

<sup>۳</sup> 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonic acid (DSS)

<sup>۴</sup> Sigma

<sup>۵</sup> Merck

<sup>۶</sup> Fluka

<sup>۷</sup> Eppendorf

<sup>۸</sup> A & D

<sup>۹</sup> Thermo

<sup>۱۰</sup> EM-5000 CE

<sup>۱۱</sup> Perkin - Elmer

۱۰۰ بیو<sup>۱</sup>، طیف‌سنج مادون قرمز نیکولت<sup>۲</sup> ۵۷۰۰، کروماتوگرافی گازی واریان ۳۴۰۰ و کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی مدل اچ پی II ۴۵۸۹۰، (شرکت هولت-پکارد<sup>۳</sup>) ساخت کشور آمریکا بودند. از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو<sup>۴</sup>) به همراه ستون ژل-تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال<sup>۵</sup> ساخت توسو<sup>۶</sup> ژاپن به منظور کروماتوگرافی غربال مولکولی استفاده شد. طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای مدل بروکر آ وی-۵۰۰<sup>۷</sup>، تبخیرکننده دورانی همراه با پمپ خلأ از شرکت هیدلف<sup>۸</sup>، دستگاه آب مقطرگیری مدل جی اف ال<sup>۱۱</sup> ۲۰۰۴، هات پلیت مدل آی کا-آرسی تی<sup>۱۲</sup>، همگی ساخت کشور آلمان، در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. دیگر لوازم آزمایشگاهی و دستگاه‌های مورد نیاز در این تحقیق عبارت بودند از انواع ستون‌های کروماتوگرافی، کیسه دیالیز با cut off ۳/۵ کیلودالتون، کیف‌های بوخنر، کاغذهای صافی، دماسنج، دسیکاتور و بن‌ماری (حمام آب گرم).

### ۳-۲- روش کار

#### ۳-۲-۱- استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه تمشک برگ

#### نارونی

#### ۳-۲-۱-۱- جداسازی ترکیبات چربی دوست

ریشه‌های پرک شده گیاه تمشک برگ نارونی با استفاده از اتانل ۹۶٪ (به نسبت ۱ قسمت ریشه به ۱۰ قسمت اتانل) در دمای جوش به مدت ۲۰ ساعت تحت فرآیند چربی‌زدایی قرار گرفتند. برای افزایش راندمان در این مرحله هر ۵ ساعت از حلال تازه (اتانل ۹۶٪) استفاده شد. هدف از این مرحله حذف ترکیباتی نظیر مونوساکاریدها، املاح معدنی، رنگ‌ها، اسیدهای آلی، اسیدآمینه آزاد و پپتیدهای

<sup>۱</sup> Varian Cary 100-Bio

<sup>۲</sup> Nicolet

<sup>۳</sup> Varian 3400

<sup>۴</sup> HP 5890 Series II GC

<sup>۵</sup> Hewlett-Packard

<sup>۶</sup> Shimadzu

<sup>۷</sup> TSK-GEL G3000 PWXL

<sup>۸</sup> Tosoh

<sup>۹</sup> Bruker AV-500

<sup>۱۰</sup> Heidolph

<sup>۱۱</sup> GFL 2004

<sup>۱۲</sup> IK-RCT

کموزن از ریشه‌ها است (برومیر و همکاران، ۲۰۰۶؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۶). پس از اتمام فرآیند، ریشه‌های فاقد چربی در زیر هود خشک شدند.

### ۳-۲-۱-۲- استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از نمونه

در این مرحله ۱۰۰ گرم از ریشه‌های فاقد چربی توسط آب مقطر (نسبت ۱ به ۱۰) در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳ ساعت تیمار شدند. این مرحله ۳ بار تکرار شد و عصاره‌های حاصل از مراحل با هم ادغام شدند (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۶). سپس ریشه‌ها از محلول استخراجی جدا و محلول آبی سانتریفیوژ و سپس صاف شد (جهان‌بین، ۱۳۹۰).

### ۳-۲-۱-۳- جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از نمونه محلول

محلول آبی حاصل علاوه بر پلی‌ساکاریدهای محلول در آب حاوی ترکیبات محلول در آب دیگری مانند پروتئین‌ها است که برای حذف آن‌ها از روش سِواگ استفاده شد. برای این منظور ۲۰٪ حجم محلول آبی، کلروفرم و ۲۰٪ حجم کلروفرم، بوتانل به نمونه اضافه شد و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. در ادامه، جداسازی محلول آبی استخراجی از کلروفرم، بوتانل و پروتئین‌های واسرشت شده، به کمک سانتریفیوژ و با جدا کردن فاز آبی رویی صورت گرفت (استایوب، ۱۹۶۵). سپس به منظور ترسیب پلی‌ساکاریدها اتانل به میزان ۳/۵ برابر حجم محلول اضافه شد و مخلوط به مدت یک شبانه‌روز در دمای یخچال قرار گرفت (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۶). جدا کردن سیال رویی از رسوبات توسط سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۴ دقیقه انجام شد. رسوبات و پلی‌ساکاریدهای محلول در آب خام توسط دستگاه تبخیرکننده دورانی خشک و توزین شدند.

### ۳-۲-۲- خالص‌سازی پلی‌ساکارید محلول در آب

برای خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای خام، از ستون‌های کروماتوگرافی حاوی دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز (۲/۶ سانتی‌متر  $\times$  ۵۲ سانتی‌متر) و سفادکس جی-۱۰۰ (۱/۶ سانتی‌متر  $\times$  ۷۰ سانتی‌متر) استفاده شد. برای آماده‌سازی ستون سلولزی از سود ۰/۵ نرمال و اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال استفاده شد به این صورت که شست‌وشوی مواد سلولزی به ترتیب توسط اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال و سود ۰/۵ نرمال

سه بار انجام شد و در نهایت دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز توسط آب مقطر شسته و در دسیکاتور خلأ به مدت ۱۵ دقیقه جهت هواگیری قرار گرفت. در ادامه دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز آماده شده با دقت درون ستون پُر و بخوبی فشرده شد. نظارت بر عمل فراکشن‌گیری توسط روش فنول-اسید سولفوریک انجام گرفت (جهان‌بین، ۱۳۹۰).

پس از آماده‌سازی ستون سلولزی، ۰/۲ گرم پلی‌ساکارید خام در آب مقطر (حدود ۱۰ میلی‌لیتر) حل و به کمک پیپت پاستور به آرامی بر روی ستون تزریق شد. فاز متحرک استفاده شده در این پژوهش آب مقطر با سرعت جریان حجمی حدود ۲/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و NaCl ۰/۱-۰/۹ نرمال بود. سپس، فراکشن‌های حاصله از ستون جمع‌آوری و به کمک تبخیرکننده دورانی خشک گردید. آماده‌سازی ستون سفادکس جی-۱۰۰ در بخش ۳-۲-۳ آمده است.

### ۳-۲-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکارید محلول در آب

پلی‌ساکارید خالص حاصل از ستون‌های کروماتوگرافی برای شناسایی و تعیین ساختار توسط آزمون‌های زیر بررسی شد.

### ۳-۲-۳-۱- طیف فرابنفش پلی‌ساکارید خالص

برای اطمینان از خلوص مناسب و حضور یا عدم حضور مواد پروتئینی در پلی‌ساکارید خالص‌سازی شده، جذب محلول پلی‌ساکاریدی در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش بررسی شد. برای این منظور محلول پلی‌ساکاریدی به داخل سلولی از جنس کوارتز ریخته شد و در داخل دستگاه اسپکترو-فوتومتر واریان کری-۱۰۰ بیو (ساخت کشور آمریکا) قرار گرفت و میزان جذب آن در ناحیه ۲۸۰ نانومتر خوانده شد (هو و همکاران، ۲۰۱۵).

### ۳-۲-۳-۲- تعیین همگنی<sup>۱</sup> و وزن مولکولی پلی‌ساکارید

برای تعیین همگنی پلی‌ساکارید محلول در آب از روش کروماتوگرافی ستونی حاوی فاز ثابت سفادکس جی-۱۰۰ استفاده شد. شست‌وشوی ستون توسط آب فاقد یون و با سرعت جریان حجمی

---

<sup>۱</sup> Homogeneity

۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه صورت گرفت (جهان بین، ۱۳۹۰). وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا<sup>۱</sup> مجهز به آشکارساز ضریب شکست نور مدل آرآی-دی-۱۰<sup>۲</sup> (شیمادزو-ژاپن) محاسبه شد. ستون مورد استفاده از جنس ژل-تی-اس کاجی ۳۰۰۰ پی وی ایکس آل ساخت توسو ژاپن و به ابعاد  $7/8 \times 300$  میلی لیتر بود. دما در طی آزمایش در  $40^{\circ}C$  ثابت نگهداشته شد و برای تهیه منحنی کالیبراسیون از استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی مشخص (۵۰۰۰، ۱۰/۰۰۰، ۴۰/۰۰۰، ۷۰/۰۰۰ و ۲۰۰/۰۰۰ دالتون) استفاده گردید (هو و همکاران، ۲۰۱۵). در نهایت وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه شد (رن و همکاران، ۲۰۱۶).

### ۳-۲-۳-۳- اندازه گیری درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید محلول در آب حاصل از ریشه های گیاه تمشک برگ نارونی با استفاده از دستگاه پلاریمتر پُرکین اِلمِر ۳۴۳ ساخت کشور آمریکا اندازه گیری شد. برای این آزمون، ۱۰۰ میلی گرم پلی ساکارید خالص با ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در حمام آب جوش به مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد و پس از آن رقت سازی صورت گرفت. برای رقت سازی ۵ میلی گرم از پلی ساکارید هیدرولیز شده به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شد و به لوله ۲ دسی متری دستگاه تزریق گردید. در نهایت درجه چرخش نوری در طول موج ۵۸۹ نانومتر و دمای  $20^{\circ}C$  قرائت شد (جهان بین، ۱۳۹۰).

### ۳-۲-۳-۴- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید

تعیین قند کل به روش رنگ سنجی فنول-اسید سولفوریک در طول موج ۴۹۰ نانومتر و با استفاده از استاندارد د-گلوکز صورت گرفت. در این آزمون به هریک از فراکشن ها (حاوی ۱ سی سی محلول قندی)، ۱ سی سی فنول ۵٪ و ۵ سی سی اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت و میزان جذب هریک قرائت شد (دووبویس و همکاران، ۱۹۵۶). مقدار

<sup>۱</sup> High performance gel permeation chromatography (HPGPC)

<sup>۲</sup> RID - 10A

اسیدهای اورونیک نمونه قندی نیز با اندازه‌گیری میزان جذب در ۵۲۵ نانومتر توسط روش رنگ‌سنجی ام-هیدروکسی‌دی‌فنیل<sup>۱</sup> و استفاده از استاندارد اسید د-گلوکورونیک انجام شد (فیلیستی-کوزی<sup>۲</sup> و همکاران، ۱۹۹۱). روش کار به این صورت بود که به ۰/۴ میلی‌لیتر محلول قندی در ظروف شیشه‌ای درب‌دار، ۲/۴ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها در حمام آب یخ، سرد شدند و به هریک ۱۵۰ میکرولیتر از معرف ام-هیدروکسی‌دی‌فنیل اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان جذب از دستگاه اسپکتروفوتومتر واریان کری-۱۰۰ بیو (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد و به منظور تعیین نوع و مقدار اسیدهای اورونیک در ساختار پلی‌ساکارید، پلی‌ساکارید خالص توسط بُروهیدریدسدیم<sup>۳</sup> احیا و تمام گروه‌های COOH- اسید اورونیک آن با CH<sub>2</sub>OH- جایگزین شد. پلی‌ساکارید حاصل تحت عنوان پلی‌ساکارید احیاء شده در آزمون تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده مشابه با تعیین کمی و کیفی واحدهای مونوساکاریدی سازنده<sup>۴</sup> پلی‌ساکارید خالص اولیه توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳۴۰۰ (ساخت کشور آمریکا) و آشکارساز یونش شعله‌ای آنالیز شد. ستون دستگاه از نوع مویینه<sup>۴</sup> مدل دی‌ام-۵۲۳۳۰ (۳۰ متر × ۰/۳۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر) بود. روش آماده‌سازی نمونه جهت تزریق به دستگاه GC به شرح زیر است:

ابتدا ۱۵ میلی‌گرم پلی‌ساکارید خالص به همراه ۲ میلی‌لیتر محلول ۲ مولار اسید تری‌فلورواستیک در لوله آزمایش ریخته شد و پس از بستن درب لوله به مدت ۲ ساعت در معرض دمای ۱۲۰°C قرار گرفت. پس از انجام هیدرولیز، اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب ۴۰°C، حذف شد و نمونه هیدرولیز شده توسط ۵۰ میلی‌گرم بُروهیدریدسدیم خنثی گردید. در ادامه، نمونه‌ها توسط اسید استیک، اسیدی شدند و اسید بوریک اضافی با کمک متانل حذف شد. آلدیتول‌های حاصل

<sup>۱</sup> M-hydroxydiphenyl

<sup>۲</sup> Filisetti-Cozzi

<sup>۳</sup> NaBH<sub>4</sub>

<sup>۴</sup> Capillary column

<sup>۵</sup> DM – 2330

توسط مخلوط پیریدین-انیدریداستیک (۱ به ۱) به مدت ۱ ساعت در حمام آب  $90^{\circ}\text{C}$  استیله شدند و به استات‌های آلدیتول مربوطه تبدیل گردیدند (ناسیمنتو<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۱۵).

برای تهیه استاندارد آزمایش، استات‌های آلدیتول مونوساکاریدهای استاندارد (د-گلوکز، د-گالاکتوز، د-مانوز، د-زایلوز، د-اسید گلوکورونیک، ال-رامنوز، ال-آرابینوز و ال-اسید گالاکتورونیک) مانند روش ذکر شده در بالا تهیه شدند و به همراه ۲ میلی‌گرم میو-اینوزیتول (به عنوان استاندارد داخلی) به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شدند (لی و همکاران، ۲۰۰۹). برنامه دمایی و زمانی تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی بدین شرح بود: دمای ستون در  $120^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای  $250^{\circ}\text{C}$  با نرخ  $8^{\circ}\text{C}$  بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در همین دما نگهداری شد. ازت به عنوان گاز حامل با سرعت جریان حجمی  $1/2$  میلی‌لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب  $250^{\circ}\text{C}$  و  $300^{\circ}\text{C}$  بود.

### ۳-۲-۳-۵- بررسی طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید

طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید محلول در آب به منظور تعیین نوع گروه‌های عاملی توسط دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز مدل نیکولت ۵۷۰۰ (مدیسون، آمریکا) حاصل شد. برای این منظور، ۱-۲ میلی‌گرم پلی‌ساکارید کاملاً خالص با پودر برومورپتاسیم (درجه خلوص اسپکتروسکوپی) مخلوط و به اندازه یک قرص ۱ میلی‌لیتری فشرده شد و در دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز قرار گرفت (چارلس<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۸). درصد نور عبور داده شده در محدوده فرکانس  $4000$  تا  $400$   $\text{cm}^{-1}$  محاسبه و نمودار حاصل از آن رسم شد (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۶).

### ۳-۲-۳-۶- هیدرولیز ناقص اسیدی

هیدرولیز ناقص اسیدی پلی‌ساکارید محلول در آب با استفاده از روش سان<sup>۳</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۹ به شرح زیر انجام شد. ۸۰ میلی‌گرم پلی‌ساکارید توسط ۳ میلی‌لیتر از محلول  $0/05$  مولار اسید تری-

<sup>۱</sup> Nascimento

<sup>۲</sup> Charles

<sup>۳</sup> Sun

فلورواستیک در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۶ ساعت هیدرولیز شد. پلی ساکارید هیدرولیز شده به منظور حذف رسوبات سانتریفیوژ شد و رسوبات جدا شده تحت عنوان پلی ساکارید ۱ نام گذاری گردید. سپس سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد و در انتها فراکشن جدا شده جمع آوری و تحت عنوان پلی ساکارید ۴ نام گذاری گردید. سیال باقی مانده در کیسه<sup>۱</sup> دیالیزی توسط اتانل رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عنوان پلی ساکارید ۲ و ۳ نام گذاری شدند. تمامی فراکشن ها پس از خشک شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، همان طور که قبلاً شرح داده شد، آنالیز شدند.

### ۳-۲-۳-۷- اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت

اکسیداسیون پریدات کاربرد گسترده ای در شیمی کربوهیدرات های غذایی، تعیین الگوی شاخه ها، تکرارپذیری آن ها و میزان شاخه دار بودن پلی ساکاریدها دارد. تجزیه اسمیت برای تکمیل کردن اکسیداسیون پریدات مناسب است. این واکنش می تواند پلی ساکاریدها را به صورت انتخابی اکسید کند و به واحدهای تکراری و کوچکتر الیگوساکارید تبدیل نماید و به این ترتیب اطلاعاتی از ساختار حاصل می شود (هو و همکاران، ۲۰۱۵).

اکسیداسیون ۲۰ میلی گرم پلی ساکارید خالص، توسط ۲۵ میلی لیتر از محلول  $0.04$  مولار پریدات سدیم<sup>۱</sup> در تاریکی انجام گرفت و هر ۴ ساعت میزان جذب محلول در طول موج ۲۲۳ نانومتر ثبت شد. پایان اکسیداسیون پس از ۹۶ ساعت، با ثابت شدن میزان جذب مشخص گردید و مازاد پریدات سدیم با افزودن اتیلن گلیکول خنثی شد. پس از پایان اکسیداسیون، میزان مصرف پریدات به روش اسپکتروفوتومتری و اسید فرمیک تولید شده با روش تیتراسیون توسط سود  $0.053$  مولار اندازه گیری شد. در ادامه دیالیز محصولات حاصل از پریدات ۴۸ ساعت به طول انجامید و خنثی سازی توسط  $50$  میلی گرم بروهیدرید سدیم در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفت (هو و همکاران، ۲۰۱۵). در نهایت هیدرولیز کامل توسط محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک، مطابق با روش مورد استفاده

<sup>۱</sup>  $\text{NaIO}_4$



برای آنالیز مونوساکاریدها، انجام گرفت و محصولات حاصل پس از استیله شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند.

### ۳-۲-۳-۸- متیله کردن پلی ساکاریدهای خالص

متیله کردن پلی ساکارید خالص بطور خلاصه در زیر آمده است:

به ۵ میلی گرم پلی ساکارید کاملاً خشک در بالن ۲۵ میلی لیتری ته گرد، ۱ میلی لیتر DMSO بوسیله سُرنگ شیشه‌ای افزوده شد. مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تحت تیمار فراصوت قرار گرفت و جهت تشکیل ژل به آن ۰/۴ میلی لیتر محلول متیل سولفینیل متیل سدیم<sup>۱</sup> توسط سُرنگ شیشه‌ای، اضافه شد. تبدیل ژل به مایع با تیمار مجدد فراصوت در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و در انتها تیمار فراصوت با افزودن ۰/۳ میلی لیتر یدیدمتیل خشک در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه تکمیل شد. برای خنثی کردن متیل سولفینیل متیل سدیم مازاد، پس از ۶ ساعت نگهداری مخلوط حاصل در دمای اتاق، به آن مقدار کمی آب اضافه شد و سوسپانسیون حاصله به لوله‌های سانتریفیوژی ۱۲ میلی لیتری انتقال یافت. پلی ساکارید متیله شده موجود در سوسپانسیون توسط ۴ میلی لیتر کلروفرم استخراج شد و توسط طیف‌سنج مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت (پازور، ۱۹۹۴). اتمام فرآیند متیله کردن با عدم مشاهده جذب در محدوده مربوط به گروه هیدروکسیل ( $3200-3700\text{ cm}^{-1}$ ) تعیین شد (هو و همکاران، ۲۰۱۵). محصولات متیله شده توسط اسید فرمیک و محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک هیدرولیز شدند و پس از حذف اسید مازاد، خنثی‌سازی توسط بروهیدرید سدیم انجام گرفت. استیله کردن آلدیتول‌های حاصل با استفاده از مخلوط پیریدین-انیدریداستیک (۱ به ۱) در حمام آب  $90^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ ساعت انجام گرفت و استات‌های آلدیتول حاصل شدند. در نهایت استات‌های آلدیتول پاره‌ای متیله شده توسط کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی مورد بررسی قرار گرفتند (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۶؛ لیانگ و همکاران، ۲۰۱۴). با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی ترکیبات مشابه در هر پیک مشخص

<sup>۱</sup> Methylsulfinyl methyl sodium

می‌شود و نسبت مولی هر ترکیب از سطح زیر پیک آن محاسبه می‌شود (زو و همکاران، ۲۰۱۶). در این پژوهش از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی مدل اچ‌پی II ۵۸۹۰، هولت-پکارد (ساخت آمریکا) حاوی ستون موئینه<sup>۱</sup> کوارتزی اچ‌پی‌اس<sup>۱</sup> در ابعاد ۲۵ متر × ۰/۲۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر، مجهز به اتوسمپلر<sup>۲</sup>، آشکارساز انتخاب‌کننده جرم<sup>۳</sup> با منبع یونیزاسیون EI<sup>۴</sup> و تزریق‌کننده جداکننده/بدون جداکننده<sup>۵</sup> استفاده شد. 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 همین دما ثابت ماند. سایر مشخصات مشابه با کروماتوگرافی گازی ذکر شده در مبحث شناسایی مونوساکاریدها بود.

### ۳-۲-۳-۹- طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR)

طیف‌سنجی NMR از روش‌های مفید برای آنالیز ساختار پلی‌ساکاریدهای پیچیده است و اطلاعات جزئی از ساختار پلی‌ساکارید از جمله ترکیب و نسبت مونوساکاریدها، موقعیت آنومرهای آلفا یا بتا، الگوی پیوندها و ترتیب واحدهای قندی در پلی‌ساکاریدها به وسیله این آزمون تعیین می‌شود (هو و همکاران، ۲۰۱۵). در این پژوهش پلی‌ساکارید خالص پس از حل شدن در حلال بی‌اثر D<sub>2</sub>O (۹۹/۹٪) بین دو قطب مغناطیس دستگاه قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده بر روی هسته‌های پروتون و کربن توسط دستگاه NMR ثبت شد. زمان بازداری ۲ ثانیه و استاندارد مورد استفاده DSS بود و جابه‌جایی شیمیایی پیک‌ها بر حسب ppm نمایش داده شد. خطوط و پیک‌ها با ارتفاع‌های متفاوت حاصل از نمونه با پیک‌ها و خطوط حاصل از جسم استاندارد مقایسه و مورد ارزشیابی قرار گرفتند. NMR پروتون پلی‌ساکارید ریشه‌های تمشک برگ نارونی در ۵۰/۱۳ مگاهرتز و <sup>13</sup>C-NMR آن در ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز توسط طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای (ساخت کشور آلمان) در دمای ۲۷°C ثبت شد.

<sup>۱</sup> HPS

<sup>۲</sup> Autosampler

<sup>۳</sup> Mass selective detector (MSD)

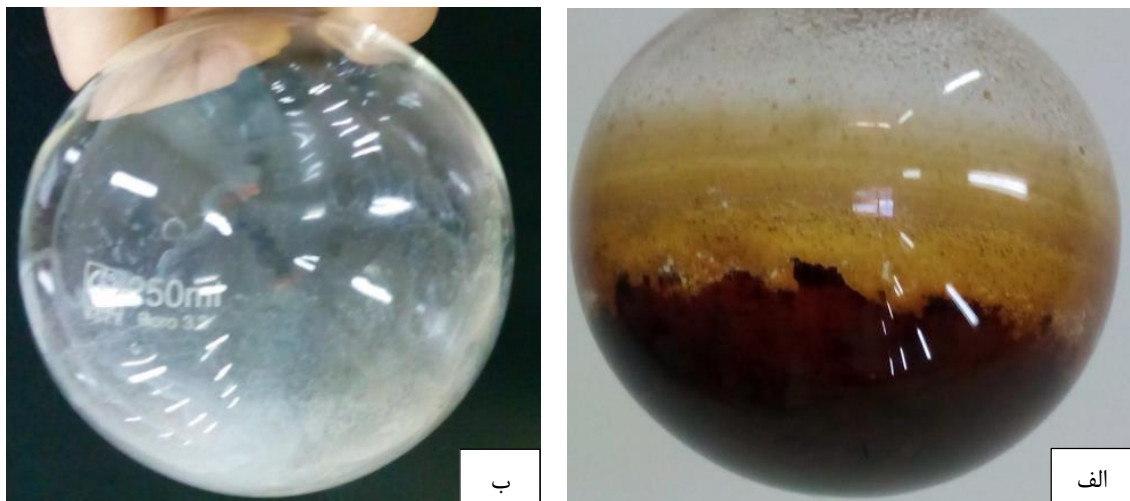
<sup>۴</sup> Electronic impact (EI)

<sup>۵</sup> Split/splitless

# فصل چہارم: تکلیف و اجتناب

#### ۱-۴- استخراج و خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب

برای استخراج پلی ساکارید ریشه گیاه تمشک برگ نارونی از آب گرم  $70^{\circ}\text{C}$  استفاده شد. پس از حذف پروتئین‌ها از محلول قندی، پلی ساکاریدهای محلول در آب توسط اتانل مطلق ترسیب شدند. از ۱۰۰ گرم ریشه خشک گیاه حدود ۱/۵۵۶ گرم پلی ساکارید خام قهوه‌ای رنگ حاصل شد (شکل ۱-۴-الف) و به علت وجود ناخالصی، عملیات خالص سازی نهایی توسط ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ انجام شد. در نهایت از ۰/۲۰۷ گرم پلی ساکارید خام وارد شده به ستون، حدود ۰/۰۷۵ گرم پلی ساکارید خالص بدست آمد. پلی ساکارید خالص کاملاً سفید رنگ بود (شکل ۱-۴-ب) و جهت انجام آزمایشات تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱-۴: پلی ساکارید ناخالص (الف) و خالص (ب) حاصل از ریشه‌های گیاه تمشک برگ نارونی.

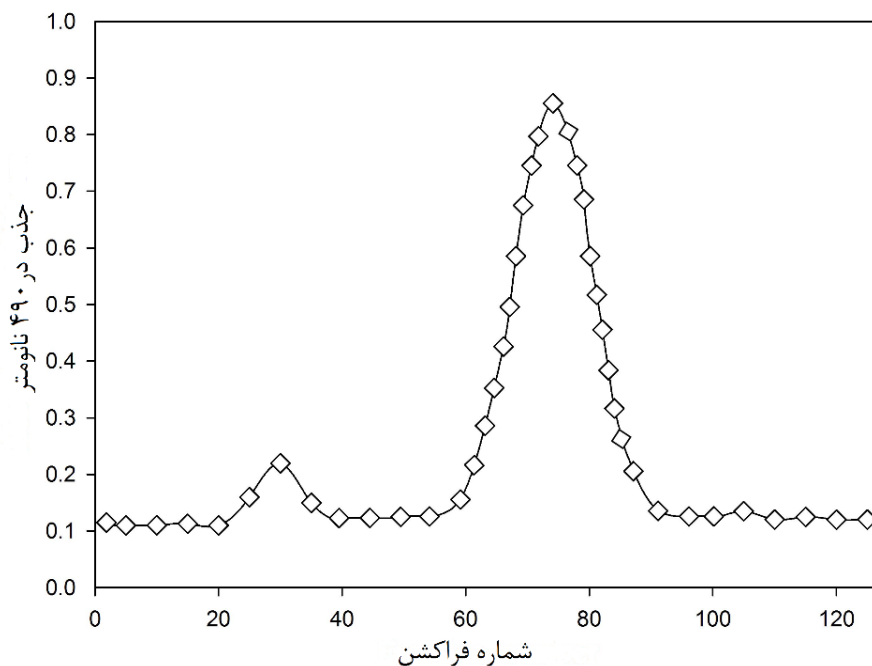
پلی ساکارید خالص در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش جذبی را نشان نداد که دلالت بر عدم وجود پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید خالص بود و نشان می‌داد که فرایند استخراج بصورت کارآمد انجام شده است.

راندمان استخراج پلی ساکارید ناخالص و خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی به ترتیب ۱/۵۶٪ و ۰/۵۶٪ بود که نسبت به راندمان استخراج پلی ساکارید ناخالص و خالص ریشه تمشک کراتاجیفولیوس

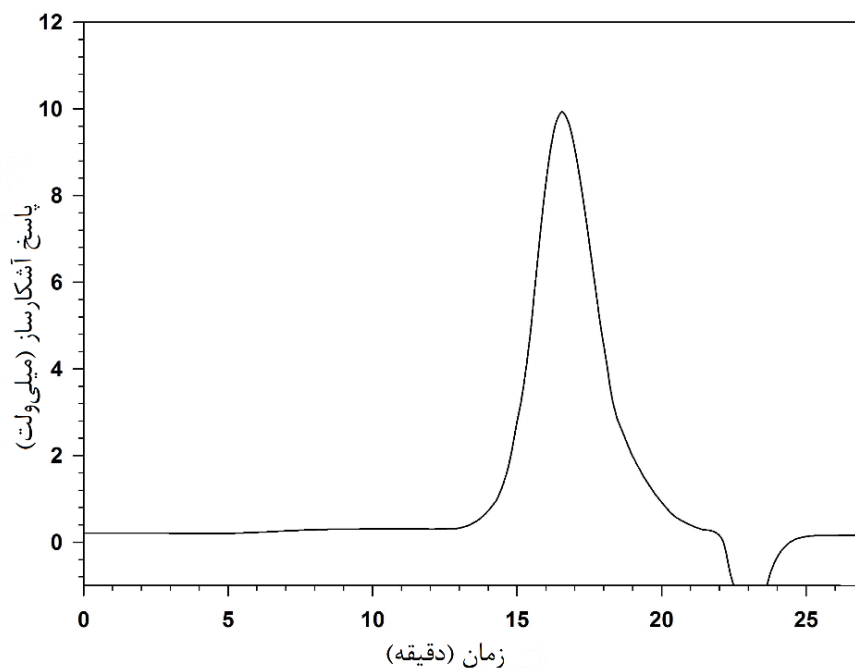
(به ترتیب ۱۱/۳٪ و ۳۲٪) کمتر است. لازم به ذکر است که، درصد راندمان پلی ساکارید خالص گزارش شده برای تمشک کراتاجیفولیوس، نسبت به مقدار پلی ساکارید ناخالص آن محاسبه شده است. یعنی از ۱۱/۳٪ پلی ساکارید ناخالص، ۳۲٪ آن، خالص بوده است. درحالیکه راندمان ناخالص و خالص پلی- ساکارید ریشه تمشک برگ نارونی، نسبت به ۱۰۰ گرم ریشه مورد استفاده برای استخراج پلی ساکارید گزارش شده است. بدین معنی که از ۱۰۰ گرم ریشه تمشک برگ نارونی، ۱/۵۶٪ پلی ساکارید ناخالص و ۰/۵۶٪ پلی ساکارید خالص بدست آمده است. پلی ساکارید خالص ریشه‌های هر دو گونه تمشک سفید رنگ بود (نی و همکاران، ۲۰۰۹) و به علت اینکه مقایسه پلی ساکاریدهای بدست آمده از میوه و برگ سایر گونه‌های تمشک با پلی ساکارید حاصل از ریشه تمشک صحیح نمی‌باشد، شباهت و تفاوت آن‌ها با پلی ساکارید خالص ریشه تمشک برگ نارونی عنوان نشده است.

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

از ستون سفادکس جی-۱۰۰ و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا (HPGPC) برای تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی استفاده شد (اشکال ۲-۴ و ۳-۴).



شکل ۲-۴: منحنی پلی ساکارید خالص حاصل از فراکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون سفادکس جی-۱۰۰.



شکل ۳-۴: کروماتوگرام پلی ساکارید خالص با استفاده از دستگاه HPGPC.

منحنی فراکشن‌های شسته شده از ستون سفادکس جی-۱۰۰ (شکل ۳-۴) دو پیک کوچک و بزرگ (نمونه غالب) را نشان می‌دهد که پیک بزرگ کاملاً متقارن بود لذا فراکشن‌های شماره ۵۰-۱۰۰ در هم ادغام و جهت تعیین وزن مولکولی توسط دستگاه HPGPC مجهز به آشکارساز ضریب شکست نور مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به شکل ۳-۴ مشاهده می‌شود که پلی ساکارید خالص پیک منحصربفرد و متقارنی دارد که بیانگر همگن بودن پلی ساکارید خالص است. میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی پس از مقایسه منحنی‌های مربوط به پلی ساکارید خالص و استاندارد دکستران، ۷/۹ کیلودالتون (۷۹۰۰ دالتون) محاسبه شد. وزن مولکولی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک کراتاجیفولیوس با استفاده از دستگاه HPGPC حدود ۷ کیلودالتون تخمین زده شد که از وزن مولکولی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی ۱۲٪ کمتر بوده است (نی و همکاران، ۲۰۰۹).

#### ۳-۴- تعیین درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی پس از اندازه گیری توسط دستگاه پلاریمتر  $196^{\circ}$  در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  محاسبه شد. درجه چرخش نوری بالاتر از  $100^{\circ}$  دلالت بر وجود سهم بیشتر اتصالات نوع آلفا نسبت به نوع بتا در ساختار پلی ساکارید خالص دارد (تسایبی، ۲۰۰۷). لذا می توان اینگونه نتیجه گرفت که واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی اکثراً از طریق اتصالات نوع آلفا ( $\alpha$ ) به یکدیگر متصل شده اند.

درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک کراتاجیفولیوس  $278/8^{\circ}$  گزارش شده است. لذا با توجه به میزان درجه چرخش نوری پلی ساکارید هر دو گونه تمشک، می توان نتیجه گرفت که واحدهای مونومری هر دو گونه از نوع آلفا هستند (نی و همکاران، ۲۰۰۹).

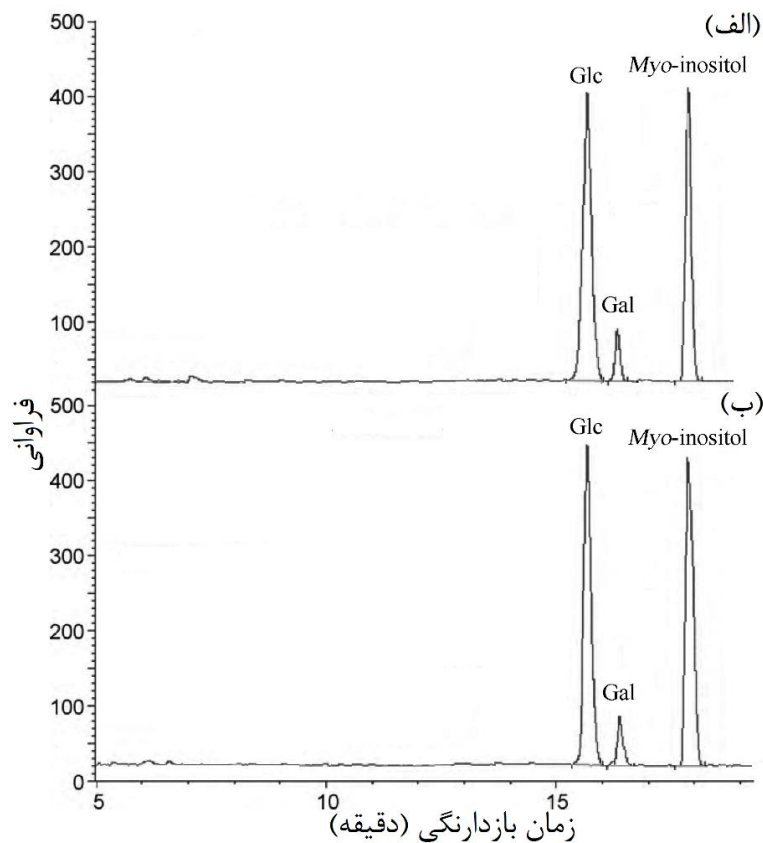
#### ۴-۴- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص

همان طور که قبلاً اشاره شد مقدار قند کل پلی ساکارید خالص توسط روش فنول-اسید سولفوریک اندازه گیری شد و مقدار  $96/3\%$  بدست آمد. درصد بالای قند ذکر شده دلالت بر درجه خلوص بسیار بالای پلی ساکارید استخراج شده داشت. برای تعیین واحدهای مونومری تشکیل دهنده پلی ساکارید، ابتدا پلی ساکارید خالص توسط اسید تری فلورواستیک به واحدهای مونومری سازنده خود هیدرولیز شد و پس از استیله شدن و تبدیل به استات های آلدیتول مربوطه، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. نتایج حاصل در شکل ۴-۴ آمده است. پلی ساکارید خالص از واحدهای مونومری گلوکز (Glc) و گالاکتوز (Gal) به ترتیب با نسبت های مولی  $6/2$  و  $0/9$  تشکیل شده بود (شکل ۴-۴-الف). مقدار اسیدهای اورونیک پس از تعیین با روش اسپکتروفتومتری حدود  $14/5\%$  بدست آمد. از این رو می توان به این نتیجه رسید که پلی ساکارید حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی از نوع اسیدی است. جهت تأیید حضور اسیدهای اورونیک در ساختار پلی ساکارید خالص و نیز تعیین انواع آنها، پلی ساکارید خالص توسط  $\text{NaBH}_4$  احیاء شد. در نتیجه فرایند احیاء، کلیه گروه های عاملی  $\text{COOH}$ - (اسیدی) در ساختار پلی ساکارید خالص به گروه های  $\text{CH}_2\text{OH}$ - تبدیل می شوند. پلی ساکارید احیاء

شده مجدداً مراحل ذکر شده جهت آماده‌سازی را طی کرد و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. نتایج حاصل (شکل ۴-۴-ب) نشان داد که پلی‌ساکارید خالص احیاء شده از واحدهای مونومری مشابه با پلی‌ساکارید خالص اصلی اما با نسبت مولی متفاوت بین واحدهای مونومری، تشکیل شده است. نسبت مولی بین گلوکز و گالاکتوز در پلی‌ساکارید احیاء شده ۷/۴ به ۱ بدست آمد. مقایسه بین نسبت‌های مولی واحدهای مونومری پلی‌ساکارید خالص اصلی و احیاء شده نشان می‌دهد که پلی-ساکارید خالص حاوی اسید گلوکورونیک به مقدار ۱۴/۳٪ است که با مقدار اسید اورونیک محاسبه شده با روش اسپکتروفتومتری سازگاری نزدیکی را نشان می‌دهد. لذا از نتایج ذکر شده می‌توان عنوان نمود که پلی‌ساکارید خالص از واحدهای مونومری گلوکز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک به نسبت مولی به ترتیب ۱، ۶/۲ و ۱/۲ تشکیل شده است. با جمع‌بندی نتایج ذکر شده می‌توان بیان کرد که گلوکز مونومر اصلی سازنده پلی‌ساکارید خالص ریشه تمشک برگ نارونی است و به احتمال زیاد در ساختار اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص به کار رفته است و سایر واحدهای مونومری (گالاکتوز و اسید گلوکورونیک) از لحاظ مقدار در اولویت بعدی قرار دارند. به عبارت دیگر پلی‌ساکارید محلول در آب غالب ریشه گیاه تمشک برگ نارونی از نوع گلوکان است و به علت وجود واحدهای اسید گلوکورونیک از نوع اسیدی است.

میزان قند کل پلی‌ساکارید ریشه گیاه تمشک کراتاجیفولیوس ۹۷/۳٪ بوده است. همچنین پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک کراتاجیفولیوس یک گلوکان است که برخلاف پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی فاقد واحدهای مونومری اسید اورونیک و گالاکتوز می‌باشد. واحدهای مونومری پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک کراتاجیفولیوس در اثر هیدرولیز آنزیمی بدست آمدند (نی و همکاران، ۲۰۰۹).





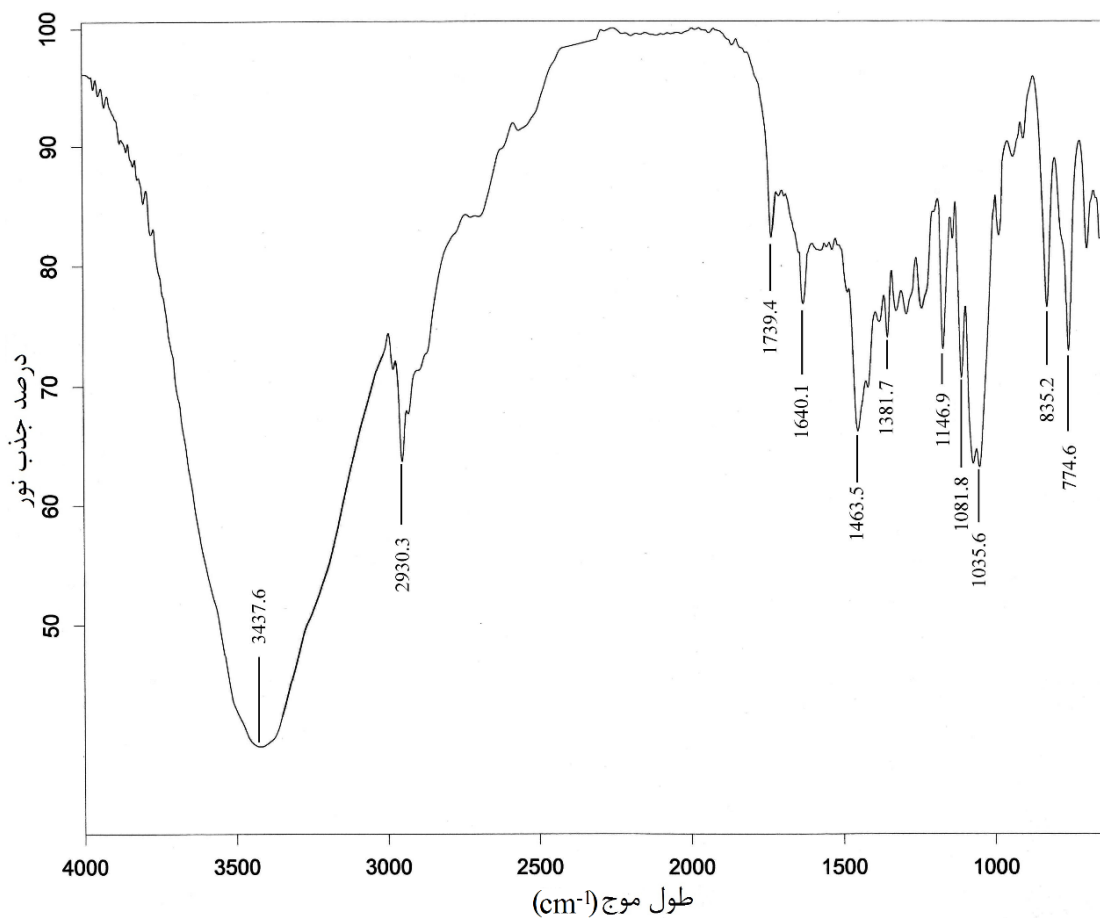
شکل ۴-۴: کروماتوگرام گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص (الف) و پلی ساکارید خالص احیاء شده (ب).

#### ۴-۵- طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص

طیف مادون قرمز پلی ساکارید ریشه گیاه تمشک برگ نارونی جهت بررسی و شناسایی گروه‌های عاملی موجود در ساختار پلی ساکارید خالص در شکل ۴-۵ نشان داده شده است.

پیک بزرگ در ناحیه  $3437/6 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده گروه‌های هیدروکسیل در پلی ساکارید خالص است درحالیکه جذب در ناحیه  $2930/3 \text{ cm}^{-1}$  بر اتصالات C-H کربن شماره ۶ قند دلالت دارد. همچنین جذب در ناحیه  $1739/4 \text{ cm}^{-1}$ ، بیانگر وجود گروه‌های کربوکسیل در ساختار پلی ساکارید خالص است. این نتیجه با نتایج حاصل از آزمون تعیین واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص مبنی بر وجود  $14/3\%$  اسید گلوکورونیک در ساختار پلی ساکارید خالص سازگاری داشت. پیک باریک در ناحیه  $1640/1 \text{ cm}^{-1}$  اتصال با آب پلی ساکارید را نشان می‌دهد و جذب در نواحی  $1463/5 \text{ cm}^{-1}$  و  $\text{cm}^{-1}$

۱۳۸۱/۷ بیانگر ارتعاشات C-H در ساختار حلقه است. پیک اتصالات اتری C-O (C-O-C) در ناحیه  $1146/9 \text{ cm}^{-1}$  و اتصالات الکلی C-O (C-O-H) در نواحی  $1081/8 \text{ cm}^{-1}$  و  $1035/6 \text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده‌اند. جذب در ناحیه  $835/2 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر وجود کنفورمسیون آنومری نوع آلفا ( $\alpha$ ) در ساختار پلی‌ساکارید خالص است (تسایی، ۲۰۰۷). این نتیجه با نتیجه حاصل از تعیین درجه چرخش نوری پلی‌ساکارید همخوانی داشت. ظهور پیک در ناحیه  $774/6 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر وجود حلقه‌های پیرانوزی در ساختار پلی‌ساکارید خالص است لذا با جمع‌بندی اطلاعات حاصل از طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص می‌توان عنوان کرد که پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی از نوع اسیدی است و از واحدهای مونوساکاریدی با اشکال پیرانوزی و اتصالات نوع آلفا ( $\alpha$ ) تشکیل شده است.



شکل ۴-۵: طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی.

#### ۴-۶- اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت

نتایج مربوط به اکسیداسیون پریدات نشان داد که ۱/۳۴ مول پریدات مصرف شد و حدود ۰/۲۷ مول اسید فرمیک تولید گردید. مقدار مصرف پریدات بیش از ۲ برابر اسید فرمیک تولید شده بود که بیانگر وجود اتصالاتی مانند ۱→۴ و ۱→۲ در ساختار پلی ساکارید خالص است که قادر به تولید اسید فرمیک نیستند. مقدار اسید فرمیک تولید شده نشان می‌دهد که اتصالاتی مانند ۱→۶ و ۱→۳ ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارند و سهم آن‌ها حدود ۲۷٪ است. مقدار پریدات مصرف شده نشان می‌دهد که اتصالات نوع ۱→۳ و مشتقات آن (۱→۳,۶، ۱→۲,۳، ۱→۳,۴) در ساختار پلی-ساکارید خالص وجود ندارد یا میزان آن‌ها بسیار کم است. با نتیجه‌گیری از موارد ذکر شده سهم اتصالات ۱→۲ و ۱→۴ در ساختار پلی ساکارید خالص حدود ۷۳٪ برآورد می‌شود.

آنالیز کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریدات کاملاً هیدرولیز شده بیانگر عدم حضور گلوکز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک بود (جدول ۴-۱). عدم حضور واحدهای مونومری ذکر شده بیانگر این حقیقت است که تمام واحدهای گلوکز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک دارای اتصالاتی مانند ۱→۶، ۱→۲، ۱→۴، ۱→۲,۶ و ۱→۴,۶ هستند که توسط پریدات به طور کامل اکسید می‌شوند. اریتریتول، گلیسرول و اسید گلیسریک (تولید شده از اسید گلوکورونیک) در محصولات حاصل از پریدات مشاهده شد. سهم بالای اریتریتول نسبت به دو مورد دیگر بیانگر وجود سهم بالای اتصالات ۱→۴ و ۱→۴,۶ در ساختار پلی ساکارید خالص است. حضور گلیسرول و اسید گلیسریک نشان می‌دهد که اتصالات دیگری مانند ۱→۱ یا ۱→۶ در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارند. عدم مشاهده رسوب در کیسه دیالیزی نشان می‌دهد که اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص کاملاً توسط پریدات اکسید شده است بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی دارای اتصالاتی مانند ۱→۲، ۱→۴، ۱→۶، ۱→۲,۶ و ۱→۴,۶ (با سهم بسیار بالای ۱→۴ و ۱→۴,۶) است که تماماً توسط پریدات اکسید می‌شوند.

جدول ۴-۱: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پیریدات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی.

نسبت‌های مولی						فراکشن‌ها
اسید گلوکورونیک	گالاکتوز	گلوکز	اریتریتول	اسید گلیسریک	گلیسرول	
<i>محصولات اکسیداسیون پیریدات</i>						
-	-	-	۵/۹۴	۰/۹۱	۰/۸۷	هیدرولیز کامل اسیدی
<i>تجزیه اسمیت</i>						
-	-	-	۶/۳۱	۱/۰۶	۱/۱۹	بیرون کیسه دیالیز
-	-	-	-	-	-	روی کیسه دیالیز
-	-	-	-	-	-	رسوب در کیسه دیالیز

#### ۴-۷- متیله کردن

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی حضور ۴ پیک متفاوت را نشان داد (جدول ۴-۲). این پیک‌ها پس از شناسایی (چاپلین<sup>۱</sup>، ۱۹۹۴) عبارت بودند از ۶,۳,۲-تری‌متیل‌گلوکز، ۳,۲-دی‌متیل‌گلوکز و ۶,۴,۳,۲-تترامتیل‌گالاکتوز که به ترتیب با نسبت‌های مولی ۴/۲۱، ۱/۹۷ و ۱/۰۶ (حدود ۴، ۲ و ۱) در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود داشتند.

جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی پلی‌ساکارید خالص متیله شده.

نسبت‌های مولی		فراگمت‌های جرمی (m/z)	نوع اتصال	قند متیله شده
پلی‌ساکارید خالص	پلی‌ساکارید خالص احیاء شده			
۴/۱۸	۴/۲۱	۲۳۳، ۱۶۲، ۱۲۹، ۱۱۸، ۱۱۳، ۱۰۲، ۹۹، ۸۷، ۵۹، ۴۵، ۴۳	→۴)-Glc <sub>p</sub> -(۱→	۲,۳,۶-Me <sub>3</sub> -Glc
۱/۹۹	۱/۹۷	۲۶۱، ۲۰۱، ۱۶۲، ۱۲۷، ۱۱۸، ۱۰۲، ۸۵، ۴۳	→۴,۶)-Glc <sub>p</sub> -(۱→	۲,۳-Me <sub>2</sub> -Glc
۱/۰۶	۱/۰۶	۲۰۵، ۱۶۲، ۱۴۵، ۱۲۹، ۱۱۸، ۱۰۲، ۹۹، ۸۷، ۷۱، ۴۵، ۴۳	Galp-(۱→	۲,۳,۴,۶-Me <sub>4</sub> -Gal
۱/۱۲	-	۲۳۳، ۱۸۹، ۱۶۱، ۱۲۹، ۱۱۷، ۱۰۱	Glc <sub>p</sub> A-(۱→	۲,۳,۴,۶-Me <sub>4</sub> -Glc

همان‌طور که قبلاً اشاره شد پلی‌ساکارید خالص حاوی اسید گلوکورونیک است لذا برای تعیین نوع اتصال آن آزمون متیله کردن بر روی پلی‌ساکارید احیاء شده نیز انجام گرفت که نتایج حاصل نشان داد

<sup>۱</sup> Chaplin

۶,۳,۲-تری‌متیل‌گلوکز، ۳,۲-دی‌متیل‌گلوکز، ۶,۴,۳,۲-تترامتیل‌گالاکتوز و ۶,۴,۳,۲-تترامتیل‌گلوکز (تولید شده از اسید گلوکورونیک) به ترتیب با نسبت‌های مولی ۴/۱۸، ۱/۹۹، ۱/۰۶ و ۱/۱۲ (حدود ۴، ۲، ۱ و ۱) در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود دارند لذا نوع اتصال اسید گلوکورونیک  $1 \rightarrow 4$  تعیین شد. نسبت‌های مولی ذکر شده با نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی‌ساکارید خالص مطابقت داشت. بعلاوه نتایج حاصل با نتایج قبلی مربوط به آزمون اکسیداسیون پیریدات و تجزیه اسمیت سازگاری داشت و بیانگر سهم بالای گلوکز با اتصال  $1 \rightarrow 4$  و  $1 \rightarrow 6$  در ساختار پلی‌ساکارید خالص بود. نسبت مولی گلوکز با اتصال  $1 \rightarrow 4$  که محل انشعاب را نشان می‌دهد مشابه با مجموع نسبت‌های مولی گالاکتوز و اسید گلوکورونیک با اتصال  $1 \rightarrow 4$  بود لذا می‌توان استنباط کرد که شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید خالص تماماً توسط واحدهای مونومری گالاکتوز و اسید گلوکورونیک به انتها می‌رسند. عدم قرارگیری گروه متیل بر روی کربن شماره ۵ تمام واحدهای مونومری ذکر شده نشان می‌دهد که تمام مونوساکاریدهای سازنده پلی‌ساکارید خالص دارای ساختار حلقه‌های ۶ ضلعی (پیرانوزی) هستند. این نتیجه با نتیجه حاصل از طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص (سیگنال در ناحیه  $1074/6 \text{ cm}^{-1}$ ) سازگاری داشت.

#### ۴-۸- هیدرولیز ناقص اسیدی

در فصل مواد و روش‌ها بخش ۳-۲-۳-۶- اشاره شد که چهار فراکشن پلی‌ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)، پلی‌ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)، پلی‌ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز) و پلی‌ساکارید ۴ (فراکشن بیرون از کیسه دیالیز) پس از انجام هیدرولیز ناقص اسیدی از پلی‌ساکارید خالص بازیافت و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (پس از هیدرولیز کامل با اسید تری‌فلورواستیک) آنالیز شدند. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی (جدول ۴-۳) نشان داد که پلی‌ساکارید ۱ و ۲ تنها حاوی گلوکز است لذا می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که واحدهای مونومری سازنده اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی گلوکز است. آنالیز واحدهای مونوساکاریدی پلی‌ساکاریدهای ۳ و ۴ حضور گالاکتوز و اسید گلوکورونیک را با نسبت‌های تقریباً برابر نشان داد لذا می‌توان نتیجه گرفت

که گالاکتوز و اسید گلوکورونیک مشترکاً اجزای مونومری شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید خالص را تشکیل می‌دهند. این نتایج با نتایج حاصل از آزمون متیله‌کردن و اکسیداسیون پیریدات و تجزیه اسمیت‌سازگاری داشت. جهت پی بردن به نوع سکانس موجود در اسکلت زنجیر اصلی پلی‌ساکارید خالص، پلی‌ساکاریدهای ۱ و ۲ با یکدیگر ادغام و مجدداً توسط ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-۱۵ شسته شدند. پس از تعیین وزن مولکولی فراکشن‌های شسته شده از ستون مشخص شد که از دو جزء با سهم زیاد و وزن مولکولی حدود ۳۴۲ دالتون (احتمالاً یک دی‌ساکارید) و سهم ناچیز با وزن مولکولی ۱۸۰ دالتون (مونوساکارید) تشکیل شده است. با توجه به آزمون متیله‌کردن و اطمینان از وجود گلوکز با اتصالات ۱→۴ با سهم بالا، می‌توان اینگونه استنباط کرد که دی‌ساکارید مالتوز سکانس غالب اسکلت زنجیر اصلی پلی‌ساکارید غالب محلول در آب ریشه گیاه تمشک برگ نارونی را تشکیل می‌دهد.

جدول ۳-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی پلی‌ساکارید خالص.

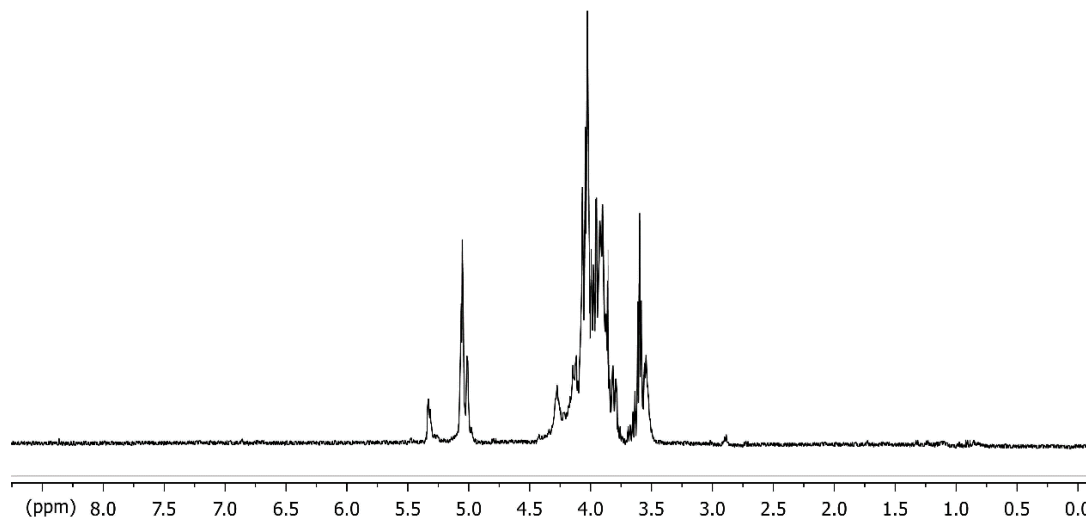
نسبت‌های مولی	فراکشن‌ها	
	گالاکتوز	اسید گلوکورونیک
۱/۰۰	–	پلی‌ساکارید ۱
۱/۰۰	–	پلی‌ساکارید ۲
–	۰/۹۸	پلی‌ساکارید ۳
–	۱/۰۸	پلی‌ساکارید ۴

#### ۹-۴- طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون و کربن

##### ۹-۴-۱- طیف NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص

باتوجه به شکل ۴-۶ وجود سیگنال در نواحی (۵/۰۵ و ۴/۹۹ ppm)، ۵/۰۳ و ۵/۲۸ به ترتیب نشان دهنده پروتون‌های آنومری آلفا-د-گلوکوپیرانوز، آلفا-د-گالاکتوپیرانوز و اسید آلفا-د-گلوکورونیک است (کویی، ۲۰۰۵). نسبت‌های سطح زیر پیک NMR پروتون واحدهای مونومری ذکر شده با نسبت مطرح شده در بخش آنالیز کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی‌ساکارید خالص

سازگاری داشت. سیگنال‌های مربوط به پروتون‌های متصل به سایر کربن‌های واحدهای مونومری در جدول ۴-۴ آمده است.



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

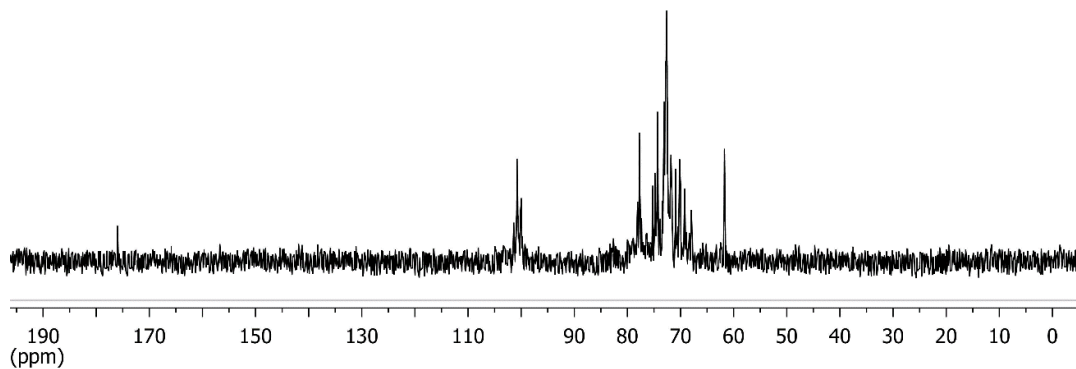
جدول ۴-۴: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR پروتون پلی ساکارید خالص.

جابه‌جایی شیمیایی، $\delta$ (ppm)						واحدهای قندی
H-۶	H-۵	H-۴	H-۳	H-۲	H-۱	
۳/۹۵	۴/۰۰	۳/۶۰	۳/۹۱	۳/۷۹	۵/۰۵	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$
۴/۱۲	۳/۷۶	۳/۵۳	۴/۰۲	۳/۷۷	۴/۹۹	$\rightarrow 4,6\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$
۳/۷۲	۴/۰۸	۳/۹۹	۳/۹۲	۳/۸۰	۵/۰۳	$\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$
-	۴/۲۶	۳/۵۷	۳/۷۵	۳/۵۷	۵/۲۸	$\alpha\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow$

#### ۴-۹-۲- طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص

شکل ۴-۷ سیگنال‌های مربوط به کربن‌های پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه تمشک برگ نارونی را نشان می‌دهد. وجود سیگنال در ۱۰۰/۳ و ۱۰۰/۱ ppm بیانگر کربن‌های آنومری آلفا-دی-گلوکوپیرانوز است و سیگنال در نواحی ۱۰۰/۵ و ۱۰۰/۲ ppm به ترتیب کربن‌های آنومری آلفا-دی-گالاکتوز و اسید

آلفا- $\beta$ -D-گلوکورونیک را نشان می‌دهد (کویی، ۲۰۰۵). به علت اینکه سیگنال‌های مربوط به کربن‌های آنومری نوع بتا ( $\beta$ ) بالای ۱۰۳ ppm ظاهر می‌شوند لذا کنفورماسیون نوع آلفا ( $\alpha$ ) برای تمام واحدهای مونومری سازنده پلی‌ساکارید خالص اثبات گردید. از طرف دیگر سیگنال‌های مربوط به کربن‌های آنومری تمام واحدهای قندی نشان می‌دهد که تماماً دارای اشکال حلقوی پیرانوزی هستند زیرا سیگنال کربن آنومری اشکال فورانوزی واحدهای مونومری ذکر شده در محدوده ۱۰۵-۱۱۰ ppm ظاهر می‌شود. وجود سیگنال در نواحی حدود ۷۷ و ۶۹ ppm به ترتیب کربن‌های شماره ۴ و ۶ گلوکز را در نقطه اتصال نشان می‌دهد. سیگنال‌های مربوط به سایر کربن‌های واحدهای قندی در جدول ۴-۵ آمده است. نتایج حاصل از طیف NMR پروتون و NMR کربن-۱۳ پلی‌ساکارید خالص با نتایج حاصل از آزمون متیله کردن، طیف مادون قرمز، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت سازگاری داشت.



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

جدول ۴-۵: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR کربن-۱۳ پلی‌ساکارید خالص.

جابه‌جایی شیمیایی، $\delta$ (ppm)						واحدهای قندی
C-۶	C-۵	C-۴	C-۳	C-۲	C-۱	
۶۲/۰	۷۱/۱	۷۶/۸	۷۳/۰	۷۲/۴	۱۰۰/۳	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow$
۶۸/۹	۷۰/۶	۷۷/۱	۷۲/۹	۷۲/۲	۱۰۰/۱	$\rightarrow 4,6\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow$
۶۱/۹	۷۲/۰	۷۰/۲	۷۰/۴	۶۸/۲	۱۰۰/۵	$\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow$
۱۷۶/۱	۷۲/۲	۷۱/۹	۷۳/۴	۷۲/۳	۱۰۰/۲	$\alpha\text{-D-GlcpA}\text{-}(1\rightarrow$





کراتاجیفولیوس، شاخه جانبی و تک واحدی گلوکز به ازای هر ۴ واحد گلوکز در زنجیر اصلی قرار دارد. تفاوت دیگر پلی ساکارید خالص ریشه این دو گونه تمشک در ابتدای زنجیر اصلی آنها است. بطوریکه در پلی ساکارید ریشه گیاه تمشک کراتاجیفولیوس یک گلوکز غیراحیاکننده و سپس یک گلوکز با اتصال (۱→۶)  $\alpha$  وجود دارد اما زنجیر اصلی پلی ساکارید ریشه گیاه تمشک برگ نارونی از اتصالات گلیکوزیدی (۱→۴)  $\alpha$  گلوکز تشکیل شده است (نی و همکاران، ۲۰۰۹).

## نتیجه گیری کلی:

همان گونه که پیش تر گفته شد این پژوهش با هدف شناسایی و معرفی یک منبع جدید پلی ساکاریدی به صنایع غذایی و افزودنی های طبیعی به منظور جانشینی برای ترکیبات نامناسب انجام گرفت و پس از بررسی گیاهان مختلف، ریشه گیاه تمشک برگ نارونی برای نیل به این هدف انتخاب شد. لذا برای اولین بار پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه تمشک برگ نارونی به روش استخراج با آب گرم، حذف ناخالصی ها و پروتئین ها و ترسیب با اتانل مطلق بدست آمد. خالص سازی پلی ساکارید استحصال با استفاده از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینواتیل سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ صورت گرفت و واحدهای مونومری سازنده، نوع کنفورماسیون مونومرها، موقعیت اتصالات گلیکوزیدی و ساختار پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی با استفاده از آزمون های شیمیایی (متیله کردن، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پیریدات و تجزیه اسمیت) و دستگاهی (GC، GC-MS، HPGPC، NMR و IR) تعیین و شناسایی شد. همچنین با بررسی و تفسیر نتایج حاصل از آزمایشات، تشخیص داده شد که پلی ساکارید خالص ریشه گیاه تمشک برگ نارونی یک گلوکان با اتصالات (۱→۴) α در زنجیر اصلی و واحدهای فرعی گالاکتوز و اسید گلوکورونیک در محل کربن شماره ۶ گلوکز است و یک هتروپلی ساکارید اسیدی منشعب می باشد.

پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه تمشک برگ نارونی به علت دارا بودن مجموعه ای از ویژگی ها همچون وزن مولکولی متوسط، میزان اسیدی بودن کم، ساختار با انشعابات کوتاه و قابلیت هضم پذیری آسان توسط انسان ها، دام ها، پرندگان، برخی از آبزیان و میکروارگانیسم های دارای آنزیم آلفا-آمیلاز و یا مالتاز دارای اهمیت است و احتمال داده می شود که توانایی محبوس کردن آب در ساختار و تشکیل ژل، حفظ ترکیبات عطری و تحمل سیستم های غذایی با اسیدیته پایین را داشته باشد و به عنوان ترکیبات پرکننده داروها مناسب باشد که البته نیازمند آزمایشات و بررسی های تکنولوژیک است تا احتمالات تئوری در عمل تأیید شوند. همچنین بسیاری از مقالات چاپ شده در سال های اخیر به

خصوصیت ایمنی‌شناسی و ضد بیماری گلوکان‌های حاصل از گیاهان پرداخته‌اند، از این‌رو مطالعه و استفاده از پلی‌ساکارید ریشه گیاه تمشک برگ نارونی در صنایع دارویی نیز پیشنهاد می‌شود.

# پیوست‌ها

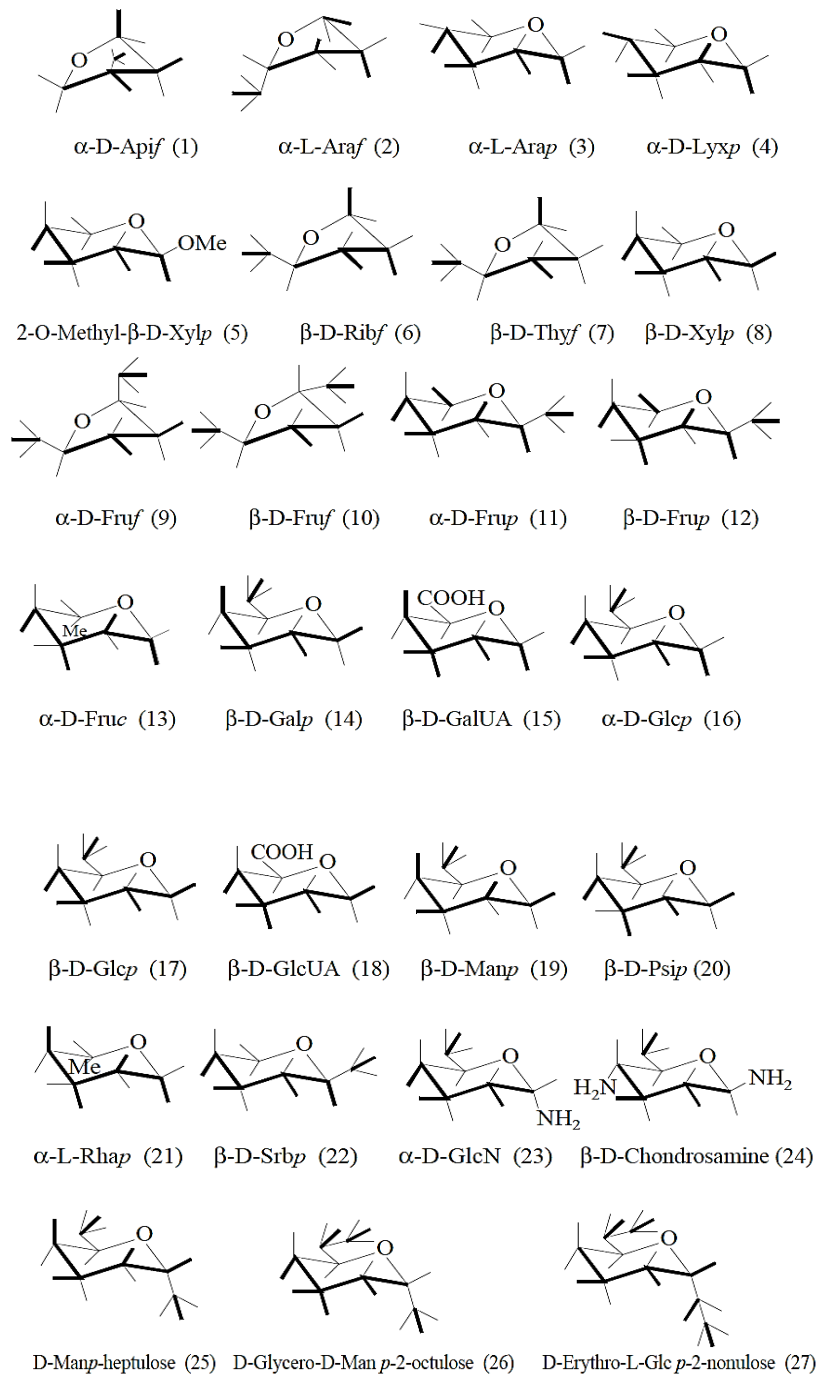
پیوست ۱: علامت اختصاری تعدادی از مهمترین مونوساکاریدها.

نام مونوساکارید	علامت اختصار
گلوکز	Glc
گالاکتوز	Gal
مانوز	Man
آرابینوز	Ara
فوکوز	Fuc
زایلوز	Xyl
رامنوز	Rha
ریبوز	Rib

پیوست ۲: ساختمان کربوهیدرات‌های خوراکی به همراه موقعیت گروه هیدروکسیل خارج از حلقه‌های فورانوز و پیرانوز

(پیوندهای تیره رنگ خارج از حلقه، گروه‌های OH هستند و  $f$  و  $p$  به ترتیب سرواژه‌ی فورانوز و پیرانوز هستند)

(توماسیک<sup>۱</sup>، ۲۰۰۴).



<sup>۱</sup> Tomasik

بیوست ۳: پلی ساکاریدهای هموزن و ساختار هتروگلیکان‌های مربوط به آن‌ها در جدول ۱ تا ۴ آمده است (آسپینال،

۱۹۸۴).

جدول (۱)

نوع پیوندها	نام‌های رایج	چگونگی پیوندها	هتروگلیکان‌های مربوطه
آلفا-دی-گلیکوزان ۱ → ۳	سرد و نایج‌ترین: قارچ استریتوکوکوس مولیس	خطی	_____
۱ → ۳ ۱ → ۴	نیچرین (مانیکودکسترین): قارچ ایزولوپچنان: قارچ	خطی، تکرار منظم و متناوب خطی، به نسبت‌های متغیر	_____
۱ → ۴	آمیروز: رایج در گیاهان خشکی که همراه با آمیلوکتین، نشاسته را تشکیل می‌دهند	خطی	در برخی از متحرها در صورت عدم حضور آمیلوکتین، ایجاد می‌شود
۱ → ۴ (به مقدار زیاد) ۱ → ۶ (به مقدار کم)	آمیلوکتین: در گیاهان رایج است گلیکوزون: در حیوانات، برخی از باکتری‌ها، مخمرها و جلبک‌ها وجود دارد.	شاخه روی شاخه می‌تواند تعداد واحدهای سازنده زنجیر تقریباً ۲۵-۲۰ واحد است. شاخه روی شاخه می‌تواند تعداد واحدهای سازنده زنجیر تقریباً ۱۶-۱۲ واحد است.	معمولاً همراه با آمیروز در گرانول‌های نشاسته وجود دارد. با وجود شباهت در ساختار، خصوصیات فیزیکی متفاوتی با آمیلوکتین دارد.
۱ → ۴ ۱ → ۶	پولولان: انواع مخمرها	خطی، غالباً منظم	_____
۱ → ۶ (به مقدار زیاد) سایر پیوندها به مقدار کم بتا-دی-گلیکوزان ۱ → ۲ ۱ → ۳	دکستران: باکتری‌ها آگروباکتیوم لومفالسمینس کالوس: معمولاً در گیاهان خشکی اما به مقدار کم کور‌دلان: به مقدار محدود در باکتری‌ها پاچیمان: به مقدار محدود در قارچ‌ها و تک سلولی‌ها لیمناران: لیمنارینا و دیگر جلبک‌های قهوه‌ای	زنجیر اصلی خطی، درجات مختلفی از شاخه با زنجیرهای جانبی کوتاه احتمالاً خطی خطی خطی _____	_____



$\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{3} \\ \text{---} \xrightarrow{4} \\ \text{---} \xrightarrow{1} \end{array}$	لیچیان، انواع گل سنگ، غلات (بخصوص جو و جو دوسری) و علفها	خطی، تا حدودی منظم	در انتهای برخی از شاخه ها دی حالتیستول وجود دارد.
$\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{2} \\ \text{---} \xrightarrow{1} \\ \text{---} \xrightarrow{6} \end{array}$ <p>(به مقدار زیاد)</p> $\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{3} \\ \text{---} \xrightarrow{1} \\ \text{---} \xrightarrow{6} \end{array}$ <p>(به مقدار کم)</p>	رایج در مخمرها	شاخه دار، نسبتاً متغیر	پلی ساکارید برخی از مخمرها ساختار خیلی منظمی با شاخه های جانبی کوتاه دارند. برخی دیگر توزیع نامشخصی دارند. زیلوگلوکان ها با زنجیر جانبی متغیر در بسیاری از گیاهان، صمغ زانتان، دی-گلوکووروزیدی-گلیکوژدی گلوکان از زانتاموناس
$\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{6} \\ \text{---} \xrightarrow{1} \end{array}$ <p>(اصلی)</p>	پوستولان، مخمرها	خطی، با شاخه های جانبی محدود	برخی از گلوکان ها از پی سیلیوم و گوندهای مربوط به آن که گروه های O-آسیل دارند. مالونیل یا ساسینیل
$\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{2} \\ \text{---} \xrightarrow{4} \end{array}$ <p>۲-استامید-۲-متوکسی-بتا-دی-گلوکان</p>	کیتین، در قارچها و دیواره سلولی پراکنده است.	خطی	با درجات مختلف N-جاستیله دیده می شوند. در کیتوزان کاملاً N-جاستیله است.
$\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{5} \\ \text{---} \xrightarrow{3} \\ \text{---} \xrightarrow{1} \end{array}$ <p>آلفا-۲-رابینوفورانان</p>	در گیاهان خشکی همچون هموگلوکان ها هستند یا به رامنوهالاکتوروان ها اتصال دارند.	شاخه دار	زیلوپیرانوا رابینوفوران ها در موسیلاژ دانه تریزیک وجود دارد.
$\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{1} \\ \text{---} \xrightarrow{2} \end{array}$ <p>بتا-دی-خروکتوفورانان ها</p>	اینولین، در گیاهان خشکی مختلف و برجستگی گل کوبک و کنگر فرنگی و برخی از جلبک های سبز یافت می شود.	خطی	معمولاً مربوط به مولکول های کم وزن می شود و توسط موجودات زنده از ساکارز و در انتهای واحدهای ساکارز تولید می شود.
$\begin{array}{c} \text{---} \xrightarrow{6} \\ \text{---} \xrightarrow{2} \end{array}$	لیوان، علفها و برخی از غلات	عمدتاً خطی	معمولاً مربوط به مولکول های کم وزن و از ساکارز تولید می شود (مانند اینولین)
	لیوان، باکتری ها	گاهی شاخه دار (۱) → (۲)، تقریباً ۱۲ واحد	وزن مولکولی تقریباً ۱۰ <sup>۶</sup> و توسط موجودات زنده از ساکارز تولید می شود.

نوع پیوندها	نام‌های رایج	چگونگی پیوندها	هتروگلیکان‌های مربوطه
$\left. \begin{array}{l} \text{آلفا-۱-فوکان (۶-دئوکسی-آلفا-۱-گالاکتان)} \\ \text{۱} \longrightarrow 2 \\ \text{بتا-دی-۱-گالاکتان‌ها} \end{array} \right\}$	فوکیدان؛ بسیاری از جلبک‌های قهوه‌ای	ممکن است برخی شاخه‌دار باشند، سولفات‌ها	گلوکوز، فوکوز، اسکوفیلان
$\left. \begin{array}{l} 1 \longrightarrow 3 \\ 1 \longrightarrow 3 \\ 1 \longrightarrow 6 \end{array} \right\}$	روزا گلایوکا معمولاً در گیاهان، به خصوص چوب درختان و معمولاً به شکل آرابینوگالاکتان‌ها	خطی بسیار شاخه‌دار	تنها مثال گزارش شده آرابینوگالاکتان (نوع دو)، ممکن است در انتهای شاخه‌ها اضافه‌شوند (معمولاً در صمغ‌های تراوشی)
$1 \longrightarrow 4$	هموگلیکان‌ها یا آرابینوگالاکتان‌های وابسته هستند و یا با پیوند کووالانسی به شاخه‌های رامنوگالاکتورونان‌ها متصلند.	زنجیر خطی در هموگلیکان‌ها	آرابینوگالاکتان (نوع اول)
$\left. \begin{array}{l} 1 \longrightarrow 4 \\ 1 \longrightarrow 6 \end{array} \right\}$	به ندرت در شرایط بحرانی یا چوب‌های متراکم به شکل هتروگلیکان وجود دارد.	شاخه‌دار	_____
$\left. \begin{array}{l} 1 \longrightarrow 3 \\ 1 \longrightarrow 6 \end{array} \right\}$	صدف‌ها، هلیکس پوماتیا	شاخه‌دار	نسبت آل به دی قندها تقریباً ۱ به ۶
$\left. \begin{array}{l} \text{آلفا-دی-۱-گالاکتوپیرانوز متصل از ۴} \\ \text{بتا-دی-۱-گالاکتوپیرانوز متصل از ۳} \\ \text{آلفا-۱-بتا-دی-۱-گالاکتان‌ها} \end{array} \right\}$	کاراجینان، جلبک‌های قرمز	خطی، واحدها متناوباً تکرار می‌شوند و دارای واحدهای ۵-سولفات هستند؛ اتصال سولفات به کربن شماره ۴ موجب از دست دادن آب از کربن‌های ۳ و ۶ می‌شود.	در قسمت‌های مختلف متیله می‌شود؛ امکان جایگزینی قندهای با اتصال ۱، ۴ و ۶ با اسیدپیرانوزیک کم است. دی-ژالوزپیرانوز بندرت در شاخه‌های جانبی وجود دارد.
$\left. \begin{array}{l} \text{آلفا-۱-گالاکتوپیرانوز متصل از ۴} \\ \text{آلفا-دی-۱-گالاکتوپیرانوز متصل از ۳} \\ \text{آلفا-دی-۱-گالاکتورونان‌ها} \end{array} \right\}$	آگارز، پورپیران، جلبک‌های قرمز	_____	_____

۴ ۱ →	پکتین: در گیاهان خشکی، معمولاً زنجبیر رامنوگالاکتوزیان را قطع می‌کند.	خطی (زنجبیر اصلی گالاکتوزیان است).	رامنوگالاکتوزیان، ساختارهای متفاوتی دارند که با سایر واحدهای قندی در شاخه‌های جانبی در ارتباط هستند.
آلفا-دی-سلان‌ها			
۳ ۱ →	به ندرت در جلبکها (سولفاته و غیرسولفاته): مربوط به چند هتروگلیکان قارچ و مخمر می‌شود (سایر قندها در شاخه جانبی قرار دارند).	خطی	زیلومتان‌ها، آرینوزیومتان‌ها و گلوکوزیومتان‌ها
۶ ۱ →	در مخمرها به عنوان ترکیبات سلول‌های سطحی با عامل تعیین کننده ایمنی دارند.	شاخه‌های تکراری و معمولاً از کربن ۶ زنجبیر اصلی با کربن ۲ شاخه فرعی ایجاد می‌شوند و در انتها پیوند ۳ → ۱ دارند.	رامنوگتان‌ها، گلوکوتان‌ها و گالاکتوزیومتان‌ها؛ برخی از واحدهای بیرونی با پیوندهای فسفودیاستر متصل شده‌اند.
بتا-دی-سلان‌ها			
۳ ۱ →	رودوفورولا گلوکونیس و مخمرهای وابسته	خطی، متناوب	
۴ ۱ →	برخی از جلبکهای قرمز	خطی	
۴ ۱ →	برخی از گیاهان خشکی	خطی	معمولاً زنجبیر اصلی از گالاکتومتان است.
۴ ۱ →	کادیدوم پسیلیوم (جلبک قرمز)	شاخه‌های محدوده سولفاته	
بتا-دی-زیلان‌ها			
۳ ۱ →	کلوریا فیلیومیس و جلبکهای سبز وابسته	خطی	
۳ ۱ →	رودیمیان: رودیمینا پالمانا و جلبکهای قرمز وابسته	خطی، نسبتاً ناپایدار	
۴ ۱ →	شایع در گیاهان خشکی، بیشتر به صورت هتروگلیکان	ضرورتاً خطی	زنجبیر جانبی کوتاه همو یا هترو مانند آرینوزیلان‌ها و (۴-۰-ستیل) گلوکوزیلان‌ها

پیوست ۴: پلی ساکاریدهای با زنجیر هتروژن و ساختار پلی ساکاریدهای مرتبط با آن‌ها (اسپینال، ۱۹۸۴).

جدول (۱)

پلی ساکارید مربوط با پیچیدگی زیاد	توزیع واحدها	نام‌های رایج	واحدهای زنجیر اصلی
در پروتئوگلیکان‌ها ۴-O و یا ۶-O از آمینو گالاکتورونیک‌ها سولفاته است.	متناوب	کوندرویتین سولفات اسکلت رابط بافت	→ 4)-β-D-Glcp A-(1- گلیکوز آمینو گلوکان
			→ 3)-β-D-Galp NAc-(1-)
در پروتئوگلیکان‌ها آمینو گالاکتورونیک‌ها بر روی ۴-O و ۲-O بر روی Ido A سولفاته هستند.	تناوب اسید اورونیک (بیشتر به شکل Ido A) و آمینو گالاکتورونیک	سولفات هیپازن: سلول‌های سطحی پستانداران	→ 4)-α-L-IdopA-(1- or
			→ 4)-β-D-GlcpA-(1- سولفات پوستی: پوست و دیگر بافت‌های مربوطه
			→ 3)-β-D-GalpNAc-(1-)
سولفات هیپازن و هیپازن از خانواده پلی ساکاریدها هستند که در آن‌ها گلوکوز آمینو Ido A سولفاته هستند. به طور کلی در سولفات هیپازن $\text{GlcA} > \text{Ido A} > \text{GlcNAc} > \text{Glc} > \text{Ido A} > \text{GlcNAc}$ پروتئوگلیکان بوجود می‌آید.	تناوب در آمینو گلوکوزونیک و اسید اورونیک	هیپازن: سلول‌های غشایی بدن پستانداران	→ 4)-β-D-GlcpA-(1- or
			→ 4)-α-L-IdopA-(1- سولفات هیپازن: سلول‌های سطحی پستانداران
			→ 4)-α-D-GlcpNAc-(1- هیپازن: سلول‌های غشایی بدن پستانداران
غیرسولفوره: بطور قطع در گروه پروتئوگلیکان‌ها قرار ندارد.	متناوب	اسید هیپارونیک: بافت‌های رابط	→ 4)-α-L-IdopA-(1- or
			→ 4)-β-D-GlcpA-(1- سولفات کراتین: نوع اول در قرینه و نوع دوم در اسکلت بافت رابط
			→ 4)-α-D-GlcpNSO <sub>3</sub> - or → 4)-α-D-GlcpNAc
گالاکتوز و آمینو گالاکتوز بر روی ۶-O سولفاته ممکن است حاوی قندهای دیگر هم باشد: پروتئو گلیکان با پیوندهای کربوهیدرات-اسید آمینه مختلف ایجاد می‌شود.	متناوب	دیواره سلولی باکتری‌ها	→ 4)-β-D-GlcpA-(1- → 3)-β-D-Galp-(1- → 4)-β-D-GalpNAc-(1-)
			→ 4)-MnrNAc-(1- → 4)-β-D-GlcpNAc-(1-)

<p>گلوکومانان‌ها</p> <p>→ 4)-β-D-Glcp-(1- )</p> <p>→ 4)-β-D-Manp-(1- )</p>	<p>عموماً در گیاهان خشکی، بخصوص در چوب کاج‌ها و خیلی از دانه‌ها</p>	<p>تقریباً ناپایدار، نظامی مشاهده نشده</p>	<p>مکالاکتوگلوکومانان‌ها، احتمالاً گروه استیل داشته باشند</p>
<p>گلوکوروزومنان‌ها</p> <p>→ 4)-β-D-GlcpA-(1- )</p> <p>→ 2)-α-G-Manp-(1- )</p>	<p>زنجیر اصلی بیشتر گلوکان‌های پیچیده، صنغن‌های تراوشی و دیواره سلولی توتون</p>	<p>متناوب</p>	<p>آر‌بی‌توزیلوگلوکوروزومنان‌ها</p>
<p>گلووروزوماتورنان</p> <p>→ 4)-β-D-ManpA-(1- )</p> <p>→ 4)-α-L-GalpA-(1- )</p>	<p>اسید آلزئیک، چلیک‌های قهوه‌ای و برخی از باکتری‌ها</p>	<p>متغیر، G، بلاک، M، بلاک و نواحی متناوب</p>	<p>—————</p>
<p>رامنوگالاکتوروزان‌ها</p> <p>→ 4)-α-D-GalpA-(1- )</p> <p>→ 2)-L-Rhap-(1- )</p>	<p>بخش‌هایی از زنجیر اصلی پکتین و ساختارهای مربوط به گلیکان‌ها، صنغن‌ها و موسیلاژها</p>	<p>متغیر در بخش‌هایی از زنجیر ماکالاکتوروزان حاصل از پکتین متصل به واحدهای تازویی برخی از صنغن‌های تراوشی</p>	<p>صنغ استرگولیا اویوس (کارابا)، موسیلاژ تخم کتان، با شاخه‌های جانبی متغیر</p>

پیوست ۵: ناحیه طیف مادون قرمز-متوسط مربوط به کربوهیدرات‌ها (کویم‌پرا<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۱۰).

Spectroscopic region (cm <sup>-1</sup> )	Assignment in the mid-IR spectral region
3650–3580	O–H stretching (free), typically sharp
3550–3200	O–H stretching (H-bonded), typically broad
3000–2800	C–H stretching, CH <sub>2</sub> and CH <sub>3</sub> —symmetric and antisymmetric
1750–1735	C=O stretching (ester group)
1720–1705	C=O stretching (in acids)
1650–1630	O–H bending (H <sub>2</sub> O)
1630–1590	C=O stretching (carboxylate group)
1470–1350	C–H bending (CH <sub>2</sub> and CH <sub>3</sub> deformation)
1470–1200	O–C–H, C–C–H, and C–O–H bending
1200–900	C–O and C–C stretching ( <i>fingerprint region</i> )
950–750	COH, CCH, and OCH bending ( <i>anomeric region</i> )

پیوست ۶: ارتعاش ویژه ساختار کربوهیدرات در IR (تسایبی، ۲۰۰۷).

Assignment	IR band (cm <sup>-1</sup> )
Ring vibration (asymmetric)	917 ± 13
Ring vibration (symmetric)	770 ± 14
Anomeric C—H (equatorial: α)	844 ± 8
Anomeric C—H (axial: β)	891 ± 7
C—H (equatorial)	880 ± 8
C—O—C stretching	1160
O—H stretching (primary)	3642
O—H stretching (secondary)	3629

<sup>۱</sup> Coimbera

# منابع

۱. اسدی، م. (۱۳۶۷). "راهنمای طرح فلور ایران". چاپ اول. انتشارات وزارت کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. تهران. ص ۳ و ۱۲-۱۳.
۲. بالسی، م. (۱۳۸۹). "مبانی طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌های پروتون و کربن". مجتهدی، م. م.، اقتداری، م. و علیشیری، ط. (مترجم). چاپ اول. اسرار دانش. تهران. ص ۱-۱۵ و ۴۰۳-۴۰۴.
۳. جلی‌جوان، ا.، رنجبر ندامانی، آ. و رنجبر ندامانی، ا. (مترجمان). راستد، ر. ای. (نویسنده). (۱۳۹۳). "شیمی کربوهیدرات‌های مواد غذایی". چاپ اول. انتشارات دانشگاه سمنان. سمنان.
۴. جلیلی‌مردی، ر. (۱۳۸۶). "میوه‌های ریز (انگور، توت‌فرنگی، کیوی، فروت، تمشک، انگورفرنگی حبه درشت، انگورفرنگی حبه ریز، ذغال‌اخته)". حسنی، ع. و ناصری، ل. (ویرایش علمی). چاپ دوم. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه واحد آذربایجان غربی. ص ۵۳ و ۱۵.
۵. جوانبخت، م.، گنجعلی، م. ر. و نوروزی، پ. (۱۳۸۶). "طیف‌بینی مادون قرمز اصول و کاربرد". چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران. تهران. ص ۴-۷.
۶. جهان‌بین، ک. (۱۳۹۰). رساله دکتر: "استخراج، شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدهای محلول در آب حاصل از ریشه گیاه چوبک تماشایی". دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی. دانشگاه تهران.
۷. حاجی‌آخوندی، ع. و بلیغ، ن. (۱۳۸۱). "راهنمای کاربردی گیاهان دارویی". چاپ اول. مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی. تهران. ص ۸۷.
۸. حاجی‌شریفی، ا. (عطار اصفهانی). (۱۳۸۹). "دایره‌المعارف اسرار گیاهان دارویی". چاپ هفتم. انتشارات حافظ نوین. تهران. ص ۲۶۶-۲۶۷.
۹. حدادی‌نژاد، م. و اکبرپور، و. (۱۳۹۳). "خواص دارویی تمشک سیاه امکانی بالقوه در توسعه صنایع غذایی مرتبط". دومین همایش ملی بهینه‌سازی زنجیره تولید توزیع و مصرف در صنایع غذایی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
۱۰. حسینی، ز. (۱۳۸۴). "روش‌های متداول در تجزیه مواد غذایی". چاپ پنجم. شورای انتشارات دانشگاه شیراز. شیراز. ص ۱۷-۱۸.



۱۱. خدیوی، ع. (۱۳۸۹). "میوه‌کاری، تشریح کامل میوه‌های معتدله، نیمه گرمسیری و گرمسیری و ریز". چاپ اول. انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی. تهران. ص ۴۴۶-۴۴۸.
۱۲. خضری، ش. (۱۳۸۱). "فرهنگ گیاهان دارویی (خواص میوه‌ها، گیاهان و سبزیجات)". چاپ اول. چاپ رستم‌خانی. سنندج. ص ۱۸۳-۱۸۶.
۱۳. خیرالدین، ح. (۱۳۸۷). "درختان و درختچه‌های مناطق خشک و نیمه خشک". چاپ اول. دانشگاه سمنان. سمنان. ص ۲۲۰-۲۲۱.
۱۴. رسول‌زادگان، ی. (مترجم). وستودد، م. ان. (نویسنده). (۱۳۷۵). "میوه‌کاری در مناطق معتدله". چاپ دوم. چاپخانه دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. ص ۱۲۳-۱۲۴.
۱۵. زندی، پ. (مترجم). فاکس، ب. ا. و کمرون، آ. ج. (نویسنده). (۱۳۷۵). "علوم غذایی از دیدگاه شیمیایی". چاپ دوم. مرکز نشر دانشگاهی. تهران. ص ۱۵۲-۱۵۳.
۱۶. صمصام شریعت، ه. و معطر، ف. (۱۳۸۳). "گیاهان و داروهای طبیعی (مفردات پزشکی) مواد مؤثر، خواص درمانی، موارد استعمال". چاپ دوم. روزبهان. تهران. ص ۵۸-۵۹.
۱۷. فاطمی، ح. (۱۳۸۶). "شیمی مواد غذایی". چاپ ششم. شرکت سهامی انتشار. تهران. ص ۲۰۶-۲۰۷.
۱۸. فرجی، ر. (۱۳۸۶). "اصول نگهداری مواد غذایی". چاپ دوم. مولف. شیراز. ص ۱۷۶-۱۷۷.
۱۹. فرحناکی، ع.، مجذوبی، م. و مصباحی، غ. ر. (۱۳۹۲). "خصوصیات و کاربردهای هیدروکلوئیدها در مواد غذایی و دارویی (ژلاتین، کتیرا، صمغ عربی، نشاسته، نشاسته اصلاح شده و پکتین)". چاپ دوم. علم کشاورزی ایران. تهران. ص ۱۲-۱۳.
۲۰. قاسمی‌عمران، س. و حدادی‌نژاد، م. (۱۳۹۳). "تمشک محصولی مستعد جهت توسعه صنایع غذایی مرتبط". دومین همایش ملی بهینه‌سازی زنجیره تولید توزیع و مصرف در صنایع غذایی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
۲۱. قربانلی، م.، لیوانی، ف. و ساطعی، آ. (۱۳۹۱). "بررسی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در دو عصاره الکلی و آب‌میوه تمشک برگ نارونی (*Rubus anatolicus* (Focke) Focke ex Hausskn.)". فصل‌نامه علمی-پژوهشی زیست بوم. شماره ۳۳-۱. ص ۱۶-۲۶.

۲۲. قنبرزاده، ب. (مترجم). دمان، ج. ام. (نویسنده). (۱۳۸۶). "مبانی شیمی مواد غذایی". چاپ سوم. آبیژ. تهران. ص ۱۰۵-۱۰۶.

۲۳. قهرمان، ا. (۱۳۷۸). "فلور رنگی ایران به سه زبان فارسی، انگلیسی و فرانسه". جلد ۲۰. چاپ اول. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع-بخش گیاه‌شناسی. ص ۲۴۶۷.

۲۴. لیوانی، ف.، قربانلی، م. و ساطعی، آ. (۱۳۹۲). "اثر بلوغ بر مقدار قندهای محلول و برخی از یون‌ها در میوه تمشک برگ نارونی (*Rubus anatolicus* (Focke) Focke ex Hausskn.)". فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی. شماره ویژه تابستان ۹۲، سال ۸، ص ۵۱-۵۸.

۲۵. مظفریان، و. (۱۳۸۸). "فرهنگ نامهای گیاهان ایران". چاپ ششم. انتشارات فرهنگ معاصر. تهران. ص ۴۶۴-۴۶۵.

۲۶. نراقی، م. (۱۳۸۲). "نسخه‌های شفابخش از سبزی‌ها و میوه‌ها". چاپ پنجم. مؤسسه انتشارات امیرکبیر. تهران. ص ۱۱۷-۱۲۰.

۲۷. نور علی یف، ی و نادر اف، س. ج. (۱۳۹۰). "گیاه درمانی (درمان سنگ کلیه به روایت ابوعلی سینا)". میرزا، م. (مترجم). محمدی، ن. (ویراستار). چاپ ششم. انتشارات گلبرگ. تهران. ص ۱۱۸-۱۲۱.

28. Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D. and Karr, A. (1967). "Method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography". *Carbohydr. Res.* 5, PP 340-345.
29. Andersson, R., Westerlund, E. and Aman, P. (2006). Cell-wall polysaccharides: structural, chemical, and analytical aspects. PP 134-136. In: "*Carbohydrate in food*". 2<sup>nd</sup>. Ed. Eliasson, A. C. CRC. Press. United States of America.
30. Asp, N. G. (1987). "Dietary fibre definition, chemistry and analytical determination". *Molec. Aspects Med.* 9, PP 17-29.
31. Aspinall, G. O. (1984). Classification of polysaccharides. PP 1-9. "*The poly saccharides*". Vol 2. Aspinall, G. O. Academic Press. London.
32. Bemiller, J. N. and Huber, K. C. (2008). Carbohydrates. PP 83-154. In: "*Fennema's food chemistry*". 4<sup>th</sup>. Ed. Damodaran, S., Parkin, K. L. and Fennema, O. R. CRC. Press. New York.

33. Brummer, Y. and Cui, S. W. (2006). Detection and determination of polysaccharides in food. PP 675-690. In: *“Food polysaccharides and their applications”*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Stephen, A. M., Phillips, G. O. and Williams, P. A. CRC. Press. New York.
34. Cartier, N., Chambat, G. and Joseleau, P. J. (1987). “An arabinogalactan from the culture medium of *Rubus fruticosus* cells in suspension”. *Carbohyd. Res.* **168**, PP 275-283.
35. Cartier, N., Chambat, G. and Joseleau, P. J. (1988). “Cell wall and extracellular galactoglucomannans from suspension-cultured *Rubus fruticosus* cells”. *Phytochemistry.* **27** (5), PP 1361-1364.
36. Casu, B. (1985). Nuclear magnetic resonance studies of polysaccharide structure and interactions. PP 1-34. In: *“Polysaccharides topics structure and morphology”*. Atkins, E. D. T. VCH Publishers. United Kingdom.
37. Chaplin, M. F. (1994). Monosaccharides. PP 34-39. In: *“Carbohydrate analysis a practical approach”*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. IRL. Press. New York.
38. Charles, A. L., Huang, T. C. and Chang, Y. H. (2008). “Structural analysis and characterization of a mucopolysaccharide isolated from roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz L.)”. *Food Hydrocolloid.* **22**, PP 184-191.
39. Clark, J. R. and Finn, C. E. (2011). “Blackberry breeding and genetics”. *FVCSB.* **5** (1), PP 27-43.
40. Coimbera, M. A., Nunes, A., Barros, A. S. and Delgadillo, I. (2010). The potential of mid-infrared spectroscopy for monitoring changes in polysaccharides and other carbohydrates during processing. PP 261-276. In: *“Applications of vibrational spectroscopy in food science. Instrumentation and fundamental applications”*. Vol 1. Li-Chan, E. C. Y., Griffiths, P. R. and Chalmers, J. M. 1<sup>st</sup>. Ed. WILEY. United Kingdom.
41. Collins, P. and Ferrier, R. (1998). *“Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products”*. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. PP 478-487.
42. Cui, H., Liu, Q., Tao, Y., Zhang, H., Zhang, L. and Ding, K. (2008). “Structure and chain conformation of a (1 → 6)- $\alpha$ -D-glucan from the root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and the antioxidant activity of its sulfated derivative”. *Carbohyd. Polym.* **74**, PP 771-778.
43. Cui, J., Gu, X., Wang, F., Ouyang, J. and Wang, J. (2015). “Purification and structural characterization of an  $\alpha$ -glucosidase inhibitory polysaccharide from apricot (*Armeniaca sibirica* L. Lam.) pulp”. *Carbohyd. Polym.* **121**, PP 309-314.

44. Cui, S. W. (2005). *“Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications”*. CRC. Press. United States of America.
45. Diasamidze, M., Vanidze, M., Djafaridze, I., Qamadadze, E. and Kalandia, A. (2013). “Phenol compounds of blackberry (*Rubus caucasicus* Focke and *Rubus anatolicus* L.) fruit and leaf”. *J. Chem. Chem. Eng.* **7**, PP 539-546.
46. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”. *Anal. Chem.* **28**, PP 350-356.
47. Handa, S. S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. PP 21-54. In: *“Extraction technologies for medicinal and aromatic plants”*. Handa, S. S., Singh Khanuja, S. P., Longo, G. and Rakesh, D. D. International centre for science and high technology. Italy.
48. Hu, H., Liang, H. and Wu, Y. (2015). “Isolation, purification and structural characterization of polysaccharide from *Acanthopanax brachypus*”. *Carbohydr. Polym.* **127**, PP 94-100.
49. Jia, X., Zhang, C., Qiu, J., Wang, L., Bao, J., Wang, K., Zhang, Y., Chen, M., Wan, J., Su, H., Han, J. and He, C. (2015). “Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from *Rhynchosia minima* root”. *Carbohydr. Polym.* **132**, PP 67-71.
50. Kato, K., Inagaki, T., Shibagaki, H., Yamauchi, R., Okuda, K., Sano, T. and Ueno, Y. (1983). “Structural analysis of the  $\beta$ -D-glucan extracted with aqueous zinc chloride from the fruit body of *Grifola frondosa*”. *Carbohydr. Res.* **123**, PP 259-265.
51. Kim, J. S., Reuhs, B. L., Michon, F., Kaiser, R. E. and Arumugham, R. G. (2006). “Addition of glycerol for improved methylation linkage analysis of polysaccharides”. *Carbohydr. Res.* **341**, PP 1061-1064.
52. Kristiansen, K. A., Potthast, A. and Christensen, B. E. (2010). “Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties”. *Carbohydr. Res.* **345**, PP 1264-1271.
53. Li, F., Yuan, Q. and Rashid, F. (2009). “Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge”. *Carbohydr. Polym.* **78** (1), PP 80-88.
54. Li, S., Zhang, D., Wu, J., Li, X., Zhang, J., Wan, M. and Lai, X. (2015). “Purification, preliminary characterization and bioactivities of polysaccharides from *Ostrea rivularis* Gould”. *Int. J. Biol. Macromol.* **80**, PP 16-22.

55. Liang, F., Hu, C., He, Z. and Pan, Y. (2014). "An arabinogalactan from flowers of *Chrysanthemum morifolium*: structural and bioactivity studies". *Carbohydr. Res.* **387**, PP 37-41.
56. Lindhorst, T. K. (2003). "*Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*". Wiley-VCH Weinheim. Germany.
57. Liu, J., Sun, Y., Yu, H., Zhang, C., Yue, L., Yang, X., Wang, L. and Liu, J. (2012). "Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer)". *Carbohydr. Polym.* **87**, PP 348-352.
58. Livani, F., Ghorbanli, M. and Sateeyi, A. (2013). "Changes in antioxidant activity and content of phenolic compounds during the ripening process of elm-leaved blackberry fruit". *Intl. J. Agron. Plant. Prod.* **4**(1), PP 88-93.
59. Miao, M., Ma, Y., Jiang, B., Huang, C., Li, X., Cui, S. W. and Zhang, T. (2014). "Structural investigation of a neutral extracellular glucan from *Lactobacillus reuteri* SK24.003". *Carbohydr. Polym.* **106**, PP 384-392.
60. Mirhosseini, H., Tabatabaee Amid, B. and Cheong, K. W. (2013). "Effect of different drying methods on chemical and molecular structure of hetero polysaccharide-protein gum from durian seed". *Food Hydrocolloid.* **31**, PP 210-219.
61. Moreno, R. B., Ruthes, A. C., Baggio, C. H., Vilaplana, F., Komura, D. L. and Lacomini, M. (2016). "Structure and antinociceptive effects of  $\beta$ -D-glucans from *Cookeina tricholoma*". *Carbohydr. Polym.* **141**, PP 220-228.
62. Newcomb, E. H. (1963). "Cytoplasm cell wall relationships". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **14**, PP 43-64.
63. Ni, W., Zhang, X., Bi, H., Iteku, J., Ji, L., Sun, C., Fang, J., Tai, G., Zhou, Y. and Zhao, J. (2009). "Preparation of a glucan from the roots of *Rubus crataegifolius* Bge. and its immunological activity". *Carbohydr. Res.* **344**, PP 2512-2518.
64. Nascimento, G. E., Corso, C. R., Werner, M. F. P., Baggio, C. H., Iacomini, M. and Cordeiro, L. M. C. (2015). "Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity". *Carbohydr. Polym.* **116**, PP 300-306.
65. Pazur, J. H. (1994). Neutral polysaccharides. PP 73-122. In: "*Carbohydrate analysis a practical approach*". 2<sup>nd</sup>. Ed. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. IRL. Press. New York.
66. Penner, M. H. (2010). Basic principles of spectroscopy. PP 375-385. In: "*Food analysis*". 4<sup>th</sup>. Ed. Nielsen, S. S. Springer. United States of America.

67. Pu, X., Ma, X., Liu, L., Ren, J., Li, H., Li, X., Yu, S., Zhang, W. and Fan, W. (2016). “Structural characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from *angelica* and *astragalus*”. *Carbohydr. Polym.* **137**, PP 154-164.
68. Qian, M. C., Peterson, D. G. and Reineccius, G. A. (2010). Gas chromatography. PP 513-540. In: “*Food analysis*”. 4<sup>th</sup>. Ed. Nielsen, S. S. Springer. United States of America.
69. Rathbone, E. B. (1985). NMR spectroscopy in the analysis of carbohydrates. PP 150-216. In: “*Analysis of food carbohydrate*”. Birch, G. G. Elsevier Applied Science Publishers. England.
70. Abdallah, M. S. and De wit, H. C. D. (1982). Resedaceae. PP 72-74. In: “*Flora Iranica*”. 149. Rechinger, K. H. Akademische Druck und Verlagsanstalt Graz. Austria.
71. Ren, D., Wang, N., Guo, J., Yuan, L. and Yang, X. (2016). “Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells”. *Carbohydr. Polym.* **138**, PP 123–133.
72. Rezaee Kivi, A. and Sartipnia, N. (2013). “Physico-chemical characterization and total phenolics of raspberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Iran”. *Intl. J. Agri. Crop. Sci.* **6** (13), PP 934-937.
73. Shi, Y., Zhao, L., Liu, X., Hu, F., Cui, F., Bi, Y., Ma, Y. and Feng, S. (2012). “Structural characterization of a sulfated glucan isolated from the aqueous extract of *Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz”. *Carbohydr. Polym.* **87**, PP 160-169.
74. Song, E. H., Shang, J. and Ratner, D. M. (2012). “Polysaccharides”. *Polymer science: a comprehensive reference.* **9**, PP 137-155.
75. Srivastava, R. and Kulshreshtha, D. K. (1989). “Bioactive polysaccharides from plants”. *Phytochemistry.* **28** (11), PP 2877-2883.
76. Staub, A. M. (1965). Removal of protein-Sevag method. PP 5-6. In: “*Methods in carbohydrate chemistry*”. 5 (2). Whistler, R. L., Bemiller, J. N. and Wolfrom, M. L. Academic Press. New York.
77. Stick, R. V. (2001). “*Carbohydrates: the sweet molecules of life*”. Academic Press. PP 19-26.
78. Sun, Y. and Liu, J. (2009). “Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*”. *Bioresource. Technol.* **100**, PP 983-986.
79. Tang, X., Yu, F., Liu, J., Gao, J., Yan, L. and Dong, M. (2014). “Isolation and identification of anti-tumor polysaccharide LSP21 from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze”. *Int. J. Biol. Macromol.* **70**, PP 138-142.

80. Tian, J., Che, H., Ha, D., Wei, Y. and Zheng, S. (2012). "Characterization and anti-allergic effect of a polysaccharide from the flower buds of *Lonicera japonica*". *Carbohyd. Polym.* **90**, PP 1642-1647.
81. Tomasik, P. (2004). Saccharides and polysaccharides: an introduction. PP 6-7. In: "*Chemical and functional properties of food saccharides*". Tomasik, P. CRC. Press. New York.
82. Tsai, C. S. (2007). "*Bio macromolecules: introduction to structure, function, and informatics*". 1<sup>st</sup>. Ed. WILEY. United States of America. PP 157, 164-165, 197.
83. Filisetti-Cozzi, T. M. C. C. and Carpita, N. C. (1991). "Measurement of uranic acids without interference from neutral sugars". *Anal. Biochem.* **197**, PP 157-162.
84. Walter, R. H. (1998). "*Polysaccharide dispersions: chemistry and technology in food*". Academic Press. United States of America. PP 123-156.
85. Wang, N., Zhang, Y., Wang, X., Huang, X., Fei, Y., Yu, Y. and Shou, D. (2016). "Antioxidant property of water-soluble polysaccharides from *Poria cocos* Wolf using different extraction methods". *Int. J. Biol. Macromol.* **83**, PP 103-110.
86. Wang, Z., Liu, Y., Sun, Y., Mou, Q., Wang, B., Zhang, Y. and Huang, L. (2014). "Structural characterization of LbGp1 from the fruits of *Lycium barbarum* L". *Food. Chem.* **159**, PP 137-142.
87. Widmalm, G. (1998). Physical methods in carbohydrate research. PP 448-493. In: "*Carbohydrate chemistry*". Boons, G. J. Blackie Academic and Professional. United Kingdom.
88. Williams, P. A. and Phillips, G. O. (2000). Introduction to food hydrocolloids. PP 1-20. In: "*Handbook of hydrocolloids*". Phillips, G. O. and Williams, P. A. CRC. Press. United States of America.
89. Wrolstad, R. E. (2012). "*Food carbohydrate chemistry*". 2<sup>th</sup>. Ed. IFT. Press. United Kingdom. PP 1-22.
90. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P. (2005). "*Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture and bioactive food components*". John Wiley & Sons, Inc. United States of America. PP 728-733.
91. Xu, J., Chen, D., Liu, C., Wu, X., Dong, C. and Zhou, J. (2016). "Structural characterization and anti-tumor effects of an inulin-typefructan from *Atractylodes chinensis*". *Int. J. Biol. Macromol.* **82**, PP 765-771.
92. Yang, L. and Zhang, L. M. (2009). "Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources". *Carbohyd. Polym.* **76**, PP 349-361.

93. Yu, Z., Liu, L., Xu, Y., Wang, L., Teng, X., Li, X. and Dai, J. (2015). "Characterization and biological activities of a novel polysaccharide isolated from raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits". *Carbohydr. Polym.* **132**, PP 180-186.
94. Zhang, T., Lu, C., Jiang, J., Wang, M. and Wang, D. (2015). "Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of *Rubus chingii* Hu". *Carbohydr. Polym.* **130**, PP 307-315.
95. Zhang, W., Li, P., Song, D., Niu, H., Shi, S., Wang, S. and Duan, J. (2016). "Structural characterization and biological activities of two  $\alpha$ -glucans from *Radix Paeoniae Alba*". *Glycoconjugate J.* PP 1-11.
96. Zhang, Z., Wang, F., Wang, M., Ma, L., Ye, H. and Zeng, X. (2015). "A comparative study of the neutral and acidic polysaccharides from *Allium macrostemon* Bunge". *Carbohydr. Polym.* **117**, PP 980-987.
97. Zhao, C., Li, M., Luo, Y. and Wu, W. (2006). "Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from fuzi, *Aconitum carmichaeli*". *Carbohydr. Res.* **341**, PP 485-491.
98. Zhao, H., Wang, Q., Sun, Y., Yang, B., Wang, Z., Chai, G., Guan, Y., Zhu, W., Shu, Z., Lei, X. and Kaung, H. (2014). "Purification, characterization and immunomodulatory effects of *Plantago depressa* polysaccharides". *Carbohydr. Polym.* **112**, PP 63-72.
99. Zheng, X., Liu, Z., Li, S., Wang, L., Lv, J., Li, J., Ma, X., Fan, L. and Qian, F. (2016). "Identification and characterization of a cytotoxic polysaccharide from the flower of *Abelmoschus manihot*". *Int. J. Biol. Macromol.* **82**, PP 284-290.



## **Abstract**

A water-soluble polysaccharide was isolated from the roots of *Rubus anatolicus* by water extraction at 70 °C and purified using chromatographic columns of Cellulose DEAE-52 and Sephadex G-100. The homogeneity and molecular weight of purified polysaccharide were determined by using HPGPC. The specific rotation, monosaccharide composition, methylation analysis, partial acid hydrolysis, periodate oxidation, Smith degradation, NMR and IR spectroscopy were used to determine polysaccharide structure. The results showed that the polysaccharide of *R. anatolicus* roots was an acidic heteropolysaccharide that has glucose, galactose and glucuronic acid in a molar ratio of 6.2: 1.0: 1.2, respectively, with a specific optical rotation of + 196° and an average molecular weight of 7900 Da. The main chain of the pure polysaccharide of *R. anatolicus* roots was composed of  $\alpha$ -D-Glcp with  $\alpha$  (1→4) linked and its side chains were made of  $\alpha$ -D-Galp-(1→ and  $\alpha$ -D-GlcpA-(1→ residues remains attached to the O-6 of glucosyls in the main chains.

**Key words:** Acidic Hetero Polysaccharide, *Rubus anatolicus*, Extraction, Putrification, Structure determination.



**Shahrood University of Technology**  
**Faculty of Agriculture**

**MSc Thesis in Food Science**

**Structural elucidation of a main water-soluble polysaccharide  
from *Rubus anatolicus* roots**

By: Neda Sahragard

Supervisor:  
Dr. Kambiz Jahanbin

September 2016