

الله أكبر



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی

مطالعه ساختاری پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه گون نوک خمیده

نگارنده:

آرزو ذوقی

استاد راهنما:

دکتر کامبیز جهان بین

شهریور ۱۳۹۵

شماره: ۳۶۰۶
تاریخ: ۳۵
ویرایش:



دولت اسلامی ایران
وزارت معارف و اوقاف و صنایع مستظرفه
فرم شماره (۶)

بسمه تعالی

فرم صورت جلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) نتیجه ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای
آرزو ذوقی به شماره دانشجویی ۹۳۰۷۷۴۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش صنایع غذایی
مطالعه ساختاری پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه گون نوک خمیده
که در تاریخ ۱۳۹۵/۶/۱۵ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

☐ قبول (با درجه: <u>بسیار خوب (۱۸-۱۸/۹۹)</u>)	☐ دفاع مجدد	☐ مردود
---	------------------------------------	--------------------------------

۱- عالی (۱۹-۲۰)

۲- خوب (۱۶-۱۸/۹۹)

۳- قابل قبول (۱۴-۱۵/۹۹)

۴- نمره کمتر از ۱۲ غیر قابل قبول

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد ارشد	دکتر کامبیز جهان بین		
۲- استاد مشاور			
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر وجهه درستکار		
۴- استاد محقق	دکتر حمیدرضا صمدلویی		
۵- استاد محقق	دکتر احمد رجایی		

رئیس دانشکده: دکتر محمد رضا عامریان

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و دورد بر محمد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز.

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

استاد گرامی جناب آقای دکتر کامبیز جهان بین که با قبول مسئولیت، راهنمایی مرا در کلیه مراحل این پروژه برعهده گرفتند.

پدر و مادرم که همواره یابوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده اند و بر عزیزانی که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه ی راهم بود.

خواهرم و برادرم که همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم هستند.

و آن عزیزانی که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه ی راهم بود و در تمام طول تحصیل همراه و همگام من بوده اند.

تعهد نامه

اینجانب: **آرزو ذوقی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته: **مهندسی کشاورزی-علوم و صنایع غذایی**

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **مطالعه ساختاری پلی ساکارید غالب محلول در**

آب از ریشه های گیاه گون نوک خمیده تحت راهنمایی: **دکتر کامبیز جهان بین** متعهد می شوم .

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

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

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی با وزن مولکولی ۴۳ کیلو دالتون و درجه چرخش نوری $+181^\circ$ توسط استخراج با آب گرم (60°C) از ریشه‌های گیاه گون نوک خمیده استخراج شد. خالص سازی پلی ساکارید توسط ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس G-۱۰۰ انجام گرفت. میزان قند کل پلی ساکارید خالص ۹۸/۹٪ تعیین شد و پلی ساکارید فاقد پروتئین و اسیدنوکلئیک بود. نتایج آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید با دستگاه کروماتوگرافی گازی نشان داد که پلی ساکارید ریشه گیاه گون نوک خمیده از واحدهای مونومری گلوکز و زایلوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱۷/۲ و ۱/۰ تشکیل شده است. شناسایی ساختار پلی ساکارید توسط تلفیقی از روش‌های شیمیایی و دستگاهی مانند متیلاسیون، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریدرات و تجزیه اسمیت، طیف مادون قرمز و طیف رزونانس مغناطیس هسته اتم‌های کربن و پروتون صورت گرفت و نتایج حاصل نشان داد که واحدهای گلوکز با اتصالات $\alpha(1\rightarrow4)$ اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص را تشکیل می‌دهند که به کربن شماره ۶ آنها، واحدهای غیر احیا کننده زایلوپیرانوز با اتصالات $\beta\text{-D-}(1\rightarrow)$ به ازای وجود هر ۱۷ واحد گلوکز در زنجیر اصلی، متصل هستند.

کلمات کلیدی: پلی ساکارید، استخراج و خالص سازی، تعیین ساختار، گون نوک خمیده

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات

مقدمه و هدف	۲
۱-۱- پلی ساکاریدها	۳
۱-۱-۱- طبقه بندی پلی ساکاریدها	۶
۱-۱-۲- حلالیت پلی ساکاریدها	۷
۱-۱-۳- کاربرد پلی ساکاریدها	۹
۱-۲- استخراج	۱۴
۱-۲-۱- انتخاب حلال	۱۴
۱-۲-۲- روش های استخراج	۱۵
۱-۳- خالص سازی	۱۷
۱-۳-۱- حذف پروتئین ها	۱۸
۱-۳-۲- حذف سایر ناخالصی ها	۱۹
۱-۴- ترسیب	۲۰
۱-۵- شناخت و تشخیص ساختمان مولکولی	۲۱
۱-۵-۱- روش های شیمیایی	۲۲
۱-۵-۱-۱- تعیین وزن مولکولی	۲۲
۱-۵-۱-۲- ترکیب مونوساکاریدهای سازنده	۲۳
۱-۵-۱-۲-۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا	۲۴
۱-۵-۱-۲-۲- کروماتوگرافی گازی	۲۵
۱-۵-۱-۳- تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی	۲۸
۱-۵-۱-۳-۱- متیله کردن	۲۸
۱-۵-۱-۳-۲- هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)	۲۹

۳۰	 اکسایش ۱-۵-۳-۳-۱-۳-۱
۳۱	 اکسایش پرپودات و تجزیه اسمیت ۱-۵-۳-۳-۱-۳-۱
۳۱	 اکسیداسیون با تری اکسید کروم ۱-۵-۳-۳-۱-۲-۳-۱
۳۲	 روش های آنزیمی ۱-۵-۲-۲
۳۳	 طیف سنجی ۱-۵-۳-۳
۳۳	 درجه چرخش نوری پلاریمتری ۱-۵-۳-۱
۳۵	 طیف سنج فرابنفش و مرئی ۱-۵-۳-۲
۳۵	 طیف سنج مادون قرمز ۱-۵-۳-۳
۳۷	 طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای ۱-۵-۳-۴
۴۰	 گون ۱-۶-۶
۴۰	 تاریخچه مطالعات سیستماتیک سرده گون ۱-۶-۱
۴۲	 پراکندگی ۱-۶-۲
۴۲	 بوم شناسی و پراکنش سرده گون ۱-۶-۳
۴۴	 رده بندی و فیلوژنی ۱-۶-۴
۴۵	 Cercidothrix سرده ۱-۶-۴-۱
۴۶	 Incani DC بخش ۱-۶-۴-۲
۴۷	 پراکنش بخش Incani DC در ایران ۱-۶-۴-۲-۱
۴۷	 خویشاوندی ها در بخش های Incani ۱-۶-۴-۲-۲
۴۷	 ضرورت و اهداف انتخاب بخش Incani ۱-۶-۴-۲-۳
۴۸	 خواص و کاربرد ۱-۶-۵
۴۹	 گون نوک خمیده ۱-۶-۶

فصل دوم: بررسی منابع

۵۲	 استخراج و خالص سازی پلی ساکارید ۲-۱-۱
۵۸	 شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها ۲-۲-۲

فصل سوم: مواد و روش‌ها

- ۱-۳- مواد اولیه و محلول‌های شیمیایی ۶۸
- ۱-۱-۳- جمع‌آوری ریشه گیاه گون نوک خمیده ۶۸
- ۲-۱-۳- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده ۶۸
- ۲-۳- دستگاه‌های مورد استفاده ۶۹
- ۳-۳- روش کار ۷۰
- ۱-۳-۳- استخراج و جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه گون نوک خمیده ... ۷۰
- ۱-۱-۳-۳- حذف مواد چربی‌دوست ۷۰
- ۲-۱-۳-۳- استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از نمونه ۷۰
- ۳-۱-۳-۳- جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب ۷۰
- ۲-۳-۳- خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها ۷۱
- ۱-۲-۳-۳- خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب ۷۱
- ۳-۳-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدهای محلول در آب گون نوک خمیده ۷۲
- ۱-۳-۳-۳- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی‌ساکارید غالب حاصل از ریشه‌های گون نوک خمیده ۷۳
- ۲-۴-۳-۳- طیف‌سنج مادون قرمز ۷۳
- ۳-۳-۳-۳- تعیین درجه چرخش نوری ۷۳
- ۵-۳-۳-۳- تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید ۷۵
- ۶-۳-۳-۳- هیدرولیز اسیدی ناقص ۷۶
- ۷-۳-۳-۳- اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت ۷۷
- ۸-۳-۳-۳- متیله کردن ۷۷
- ۹-۳-۳-۳- طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای ۷۸

فصل چهارم: نتایج و بحث

- ۱-۴- استخراج و خالص‌سازی پلی‌ساکارید گون نوک خمیده ۸۰
- ۲-۴- تعیین درجه چرخش نوری ۸۱

۳-۴	تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص	۸۱
۴-۴	تعیین قند کل و شناسایی واحدهای مونومری پلی ساکارید خالص	۸۳
۵-۴	طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص	۸۵
۶-۴	هیدرولیز ناقص اسیدی	۸۶
۷-۴	اکسیداسیون پریدوات و تجزیه اسمیت	۸۷
۸-۴	متیله کردن	۸۸
۹-۴	طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون و کربن	۸۹
	نتیجه گیری کلی	۹۳
	منابع مورد استفاده	۹۵

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: شکل گیری منحنی مارپیچ زنجیره کربوهیدرات ۵
- شکل ۱-۲: برخی مونوساکاریدهای مهم در ساختار پلی ساکاریدها ۱۲
- شکل ۱-۳: کروماتوگرام ترکیبی استاندارد استات‌های آلدیتول ۲۷
- شکل ۱-۴: شکل مربوط به ریشه و اندام‌های هوایی گون نوک خمیده ۵۰
- شکل ۱-۲: ساختار شیمیایی Astragaloside IV ۵۸
- شکل ۲-۲: ساختار پلی ساکارید گون ممبراناسه ۶۰
- شکل ۲-۳: آنالیز TLC پلی ساکارید ریشه گون ممبراناسه ۶۳
- شکل ۱-۴: پلی ساکاریدهای حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده خام (راست) و کاملاً خالص (چپ) ۸۰
- شکل ۲-۴: منحنی جذب فراکشن‌های جمع‌آوری شده پس از شست و شوی پلی ساکارید خالص با ستون سفادکس ۱۰۰-G ۸۲
- شکل ۳-۴: کروماتوگرام پلی ساکارید خالص با استفاده از دستگاه HPGPC ۸۲
- شکل ۴-۴: کروماتوگرام گازی واحدهای مونوساکاریدی تشکیل‌دهنده پلی ساکارید خالص ۸۴
- شکل ۵-۴: طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده ۸۵
- شکل ۶-۴: طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص ۹۰
- شکل ۷-۴: طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص ۹۱
- شکل ۸-۴: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده ۹۲

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: طبقه‌بندی پلی‌ساکاریدها بر اساس منشأ آنها..... ۷
- جدول ۱-۲: عوامل تعیین کننده توابع پلی‌ساکارید در سیستم غذایی..... ۹
- جدول ۱-۳: پیوند گلیکوزیدی در برخی از پلی‌ساکاریدها و منبع آنها ۱۱
- جدول ۴-۱: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی پلی‌ساکارید خالص..... ۸۷
- جدول ۴-۲: نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت پلی‌ساکارید خالص ۸۸
- جدول ۴-۳: نتایج کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی پلی‌ساکارید خالص متیله شده ۸۹
- جدول ۴-۴: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص ۸۹
- جدول ۴-۵: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR کربن پلی‌ساکارید خالص ۹۱

فصل اول

کلیات

مقدمه و هدف

کشور پهناور ایران با وسعت زیاد و تنوع آب و هوایی و خاک و نیز با وجود شرایط زمین‌شناسی و توپوگرافی خاص در مرزهای سیاسی خود به ویژه در غرب و همچنین نفوذ اقلیم آب و هوایی و برخورد جریان‌های گوناگون جوی در مناطق مختلف کشور، شرایط مطلوبی را برای پیدایش گیاهان و استقرار و پایداری آن‌ها فراهم آورده است. جنس گون در میان گیاهان گل‌دار از بزرگ‌ترین جنس‌هاست. پیرامون تنوع گونه‌ای در این جنس مقالات متعددی چاپ شده است؛ با این وجود به نظر می‌آید بررسی دقیق و همه‌جانبه این جنس در قسمت‌های مختلف جهان هنوز نیاز به تحقیق و بررسی‌های دقیق‌تر و عمیق‌تری دارد.

در حال حاضر استفاده از پلی‌ساکاریدها که موادی تجدیدپذیر و سازگار با محیط هستند، در مواد غذایی فراوری شده، حدود ۱۰٪ از کل کاربرد آن‌ها در صنعت مواد غذایی است و با توجه به اینکه عمده پلی‌ساکاریدهایی که در صنعت مواد غذایی استفاده می‌شوند از منابع گیاهی و نیز جلبک‌ها هستند، تعیین و ساختار پلی‌ساکاریدها و تعیین ویژگی‌های عملکردی پلی‌ساکاریدها، امکان استفاده از آن‌ها را در بخش گسترده‌ای از صنعت از جمله صنایع غذایی فراهم می‌کند. تا کنون در خصوص پلی‌ساکاریدهای محلول در آب و ویژگی‌های عملکردی گونه گون نوک خمیده تحقیقاتی صورت نگرفته است. با توجه به اینکه گون نوک خمیده در کشورهای دیگر مانند استرالیا، ایالات متحده، عراق، فرانسه و ... پراکنده است لذا انجام هرگونه مطالعه پیرامون ویژگی‌ها و ساختار آن از اهمیت بالایی برخوردار است. از این رو در پایان نامه پیش رو ساختار پلی‌ساکارید غالب محلول در آب حاصل از ریشه‌های گون نوک خمیده که از گونه‌های شناخته شده گون در کشور ایران است مورد بررسی قرار گرفته، به این امید که نتایج این پایان‌نامه بتواند راه مطالعات آتی را برای پژوهشگران و دست‌اندرکاران رشته‌های صنایع غذایی، داروسازی، پلیمر، پزشکی، منابع طبیعی و ... هموار کند.

۱-۱- پلی ساکاریدها

کربوهیدرات‌ها پلی هیدروکسی کربونیل^۱هایی هستند که به مقدار زیادی در سلول‌های گیاهان و جانوران وجود داشته و هر دو نقش ساختمانی و متابولیک را بر عهده دارند (Murray, 2009). آن‌ها موادی فراوان، ارزان قیمت و در دسترس هستند و بیش از ۹۰٪ از ماده خشک گیاهان را تشکیل می‌دهند. کربوهیدرات‌ها به صورت تک‌واحدی (تک قندی یا مونوساکارید)، دو قندی‌ها (دی‌ساکاریدها)، چندقندی‌ها (الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها) تقسیم‌بندی می‌شوند (Bemiller and Whistler, 1996).

پلی‌ساکاریدها کربوهیدرات‌های نسبتاً پیچیده‌ای هستند و به عنوان فراوان‌ترین ترکیب آلی، نیمی از کربن آلی موجود در زمین را تشکیل می‌دهند (Venugopal, 2011). گاهی اوقات این مواد نقش منبع ذخیره‌ی انرژی را دارند مانند نشاسته، گلیکوژن و برخی از پلی‌ساکاریدهای دانه‌های گیاهان مثل لوبیای خرنوب و صمغ گوار. گاهی اوقات پلی‌ساکاریدها با تشکیل یک شبکه سه‌بعدی هیدراته به تمامیت ساختاری و مقاومت مکانیکی بافت‌های گیاهی کمک می‌کنند. این نقش را پکتین در گیاهان و کاراگینان‌ها، آگار و آلژینات در گونه‌های دریایی ایفا می‌کنند (Lapasin and Pricl, 1995).

به طور کلی پلی‌ساکاریدها را گلیکان^۲ می‌نامند که تفاوت آن‌ها در نوع پیوند گلیکوزیدی، درجه و نوع شاخه‌ها، طول زنجیره گلیکان، جرم مولکولی و ترکیب پیوند پلیمر است. پلی‌ساکاریدها دارای فرمول کلی $C_x(H_2O)_y$ هستند که در آن معمولاً x عددی بین ۲۰۰ تا ۲۵۰۰ است. آن‌ها از واحدهای مونوساکارید ساخته شده‌اند که توسط پیوندهای گلیکوزیدی به یکدیگر متصل می‌شوند، از این رو مولکول‌هایی درشت و اغلب شاخه‌دار و منشعب هستند و در ترکیب مونوساکاریدها، طول زنجیره و تعداد شاخه‌ها با یکدیگر تفاوت دارند (Venugopal, 2011). در نام‌گذاری سیستماتیک، هنگامی که

^۱ Polyhydroxy carbonyl

^۲ Glycan

پلی ساکارید از یک نوع مونوساکارید تشکیل شده باشد، پسوند اوز^۱ جایگزین آن^۲ در انتهای نام مونوساکارید می شود و همچنین در مواردی که پلی ساکارید حاوی بیش از یک نوع مونوساکارید در ساختار خود باشد، نام گذاری بر اساس نوع واحد ساختاری زنجیر اصلی و پیشوند نام اجزای دیگر تعیین می شود (Wrolstad, 2012).

از هیدرولیز پلی ساکاریدها معمولاً بیش از ۱۰۰ واحد مونوساکارید حاصل می شود. پلی ساکاریدها بر اساس ماهیت مونوساکاریدهای حاصل از هیدرولیزشان، هگوزانها یا پنتوزانها نیز نامیده می شوند. قندهای پیچیده با حذف آب از اتصال قندهای ساده به دست می آید. یک مونوساکارید یا قند ساده یک آلدئید یا کتون با حداقل دو گروه هیدروکسیل است و بر اساس تعداد کربن موجود می تواند به زیرگروه های تریوز^۳، تتروز^۴، پنتوز^۵، هگوز^۶، هپتوز^۷ یا اکتوز^۸ تقسیم بندی شود. ساختمان حلقوی یک آلدوز به صورت همی استال است، زیرا از ترکیب یک گروه آلدئید و یک گروه الکلی تشکیل شده است. به همین ترتیب ساختمان حلقوی یک کتوز به صورت همی کتال است (Murray, 2009). آلدئیدها و کتونها با الکلها متراکم می شوند و به ترتیب همی استال و همی کتال تشکیل می دهند. در شرایط الکل اضافی و آب گیری، تراکم زیاد باعث تشکیل استالها و کتالها خواهد شد. شکل های حلقوی فورانوزی و پیرانوزی قندها، که به صورت همی استال یا همی کتال هستند، از تراکم درون مولکولی گروه کربونیل با جایگزینی هیدروکسیل تشکیل می شوند. زمانی که این واکنش اتفاق می افتد دو محصول تشکیل خواهد شد و چون گروه هیدروکسیل در کربن آنومری امکان دو جهت گیری را دارد به صورت اشکال آنومری آلفا و بتا نشان داده می شود (Wrolstad, 2012).

^۱ Ose

^۲ An

^۳ Triose

^۴ Tetrose

^۵ Pentose

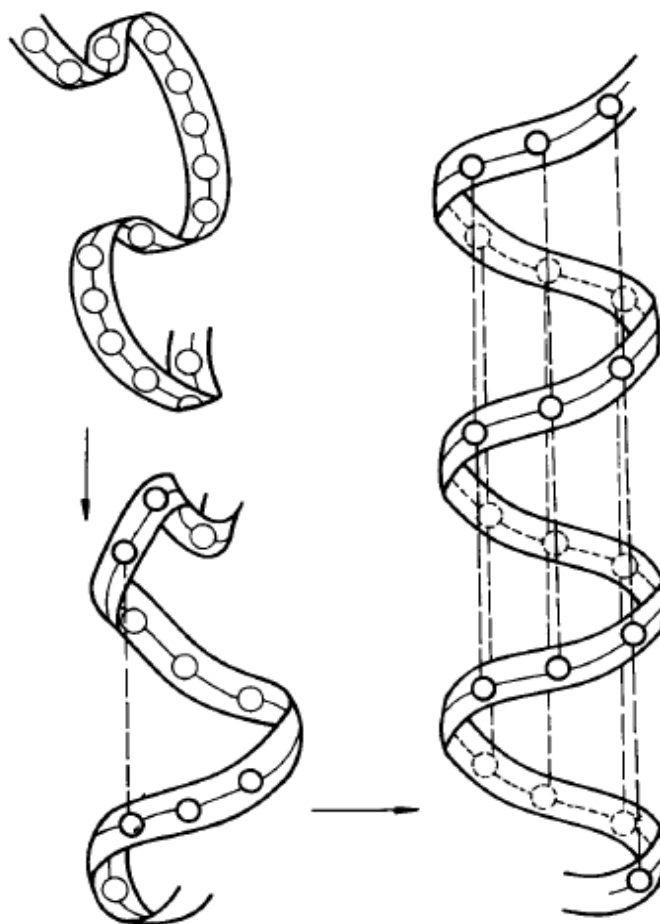
^۶ Hexose

^۷ Heptose

^۸ Actose

ساختار اولیه پلی ساکاریدها نشان دهنده توالی کووالانسی واحدهای مونومر در طول زنجیر است. پیوند کووالانسی بین قندهای مجاور کاملاً انعطاف پذیر نیست اما مونومرها را به یک خط باریکی با جهت گیری نسبی محدود می کند؛ بنابراین، جدا کردن یک زنجیر پلی ساکارید تنها می تواند با شکل خاصی - ساختار ثانویه - که وابسته به ساختار اولیه است، اتخاذ شود. در درجه بالاتر تعاملات انرژی مطلوب بین زنجیرها شکل می گیرد که به ساختار سوم منجر می شود (Lapasin and Pricl, 1995).

در شکل ۱-۱ زنجیر کربوهیدراتی به صورت تبدیل مارپیچ تصادفی به منحنی مارپیچ از طریق حد واسط یک چرخش و سپس سه چرخش از منحنی مارپیچ آورده شده است. پیوند هیدروژنی به صورت خطوط نقطه چین نشان داده شده است (Rees, 1977).



شکل ۱-۱: شکل گیری منحنی مارپیچ زنجیره کربوهیدرات (Rees, 1977).

۱-۱-۱- طبقه‌بندی پلی‌ساکاریدها

آلدئیدها و کتون‌ها به‌طور هدفمند به‌صورت آلکانال^۱ و آلکانول^۲ نام‌گذاری می‌شوند. گروه کربونیل بر عامل هیدروکسی و پیوند دوگانه و سه‌گانه کربن-کربن در ترتیب شماره‌گذاری ارجحیت دارد. با این قواعد روش کلی برای شماره‌گذاری تنه اصلی و علامت‌گذاری استخلاف‌ها دنبال می‌شود (میر محمد صادقی و همکاران، ۱۳۹۲).

پلی‌ساکاریدها بسته به ترکیب شیمیایی می‌تواند از نوع هموپلی‌ساکارید^۳ باشند که در آن‌ها تمام مونو-ساکاریدها از یک نوع هستند و یا هتروپلی‌ساکارید^۴ که در آن بیش از یک نوع مونوساکارید موجود است. هموپلی‌ساکاریدها اغلب بر اساس واحد قندی خود نام‌گذاری می‌شوند. برای مثال هموپلی‌ساکاریدِ گلوکز، گلوکان^۵ و هموپلی‌ساکاریدِ مانوز، مانان^۶ نامیده می‌شود (Venugopal, 2011).

هموپلی‌ساکاریدها می‌توانند با توجه به پیکربندی یا موقعیت اتصال حلقه‌های زنجیر همو و هترو داشته باشند. هتروپلی‌ساکاریدها می‌توانند علاوه بر انواع مختلف واحدهای مونوساکارید، اتصال متنوعی نیز داشته باشند. بنابراین هتروپلی‌ساکاریدها می‌توانند انواع مختلف و متوالی از واحدهای مونوساکارید و نیز همچنین انواع مختلف و متوالی پیوند گلیکوزیدی داشته باشند. این امکان تنوع بی‌حد و حصری در ساختار ایجاد می‌کند. برخی از پلی‌ساکاریدها تنها از واحدهای قندی تشکیل شده‌اند که به‌عنوان پلی‌ساکاریدهای خنثی شناخته می‌شوند مانند آمیلوز، آمیلوپکتین و سلولز. پلی‌ساکاریدهای حاوی قندهای اسیدی در ساختارشان بارهای منفی حمل می‌کنند و بنابراین پلی‌ساکاریدهای آنیونی^۷ هستند. برای مثال پکتین از اسید گالاکتورونیک ساخته می‌شود درحالی‌که آلژینات اسیدهای گولورونیک و مانورونیک دارد. تنها پلی‌ساکارید کاتیونی شناخته شده کیتوزان^۸ است (Cui, 2005).

^۱ Alkanal

^۲ Alkanol

^۳ Homopolysaccharide

^۴ Heteropolysaccharide

^۵ Glucan

^۶ Mannan

^۷ Anionic

^۸ Chitosan

جدول ۱-۱: طبقه‌بندی پلی‌ساکاریدها بر اساس منشأ (Cui, 2005).

نام	منبع
آلجینات، کاراگینان، آگار	جلبک دریایی
پکتین، آرابینوزایلان، آرابینوگالاکتان، گلوکورونوزایلان	گیاهان عالی
بتا-گلوکان، اینولین، سلولز، زایلان، صمغ عربی، صمغ تراگاکانت، صمغ کاریا، صمغ گوآر، خرنوب، کونیاکومانان	بذر، میوه، سبزیجات، (بخش خوراکی و غیر خوراکی)، دانه، قارچ، ریشه
صمغ زانتان، ژلان، پولولان، دکستران، کوردلان، لوان	میکروبی
اکسکلروگلوکان، زوگلان، ولان	
گلیکوژن، کیتین، کیتوزان، گلیکوسامینوگلیکان	حیوانی

۱-۱-۲-حلالیت پلی‌ساکاریدها

کربوهیدرات‌ها از قانون کلی حلالیت تبعیت می‌کنند. آن‌ها با دارا بودن چندین گروه هیدروکسیل در آب و الکل بسیار محلول‌اند و در حلال‌های غیر قطبی حلالیت کمی دارند. هر قند محدوده قابل توجهی از حلالیت را از ۳۰٪ تا ۸۰٪ وزنی در آب نشان می‌دهد. برخی عوامل که حلالیت قندها در آب را تحت تأثیر قرار می‌دهند اعم از گروه‌های هیدروکسیل تمایل دارند که به آسانی در دسترس قرار بگیرند تا با آب پیوند هیدروژنی دهند به عنوان مثال مانوز و گالاکتوز پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی ایجاد می‌کنند و حلالیت در آب کمتری از گلوکز دارند. مونوساکاریدها نسبت به پلی‌ساکاریدها گروه‌های هیدروکسیل آزاد بیشتری در هر واحد قند دارند و حلالیت آن‌ها در آب بیشتر است. مالتوز در محلول آبی حالت ترکیبی اتخاذ می‌کند به طوری که گروه‌های آب‌گریز درونی از دو واحد گلوکز را به سمت یکدیگر سوق داده و به مولکول خاصیت آب‌دوستی بیشتری می‌دهد، همچنین مالتوز حلالیت بیشتری در آب نسبت به سلوبیوز دارد. در شکل ۱-۲ برخی از مونوساکاریدهای مهم موجود در ساختار پلی‌ساکاریدها آمده است (Wrolstad, 2012).

اغلب پلی ساکاریدها حاوی واحدهای گلیکوزیل هستند که به طور متوسط ۳ گروه هیدروکسیل دارند و هر گروه امکان ایجاد پیوند هیدروژنی به یک یا تعداد بیشتری از مولکول های آب را دارد. در سیستم های آبی ذرات پلی ساکارید بعد از جذب آب متورم شده و معمولاً به صورت جزئی یا کامل حل می شوند. به علت اصلاح پلی ساکاریدها و کنترل آب آزاد در سیستم های غذایی، آب نقش مهمی در تأثیرگذاری خواص فیزیکی و کاربردی پلی ساکاریدها دارد. پلی ساکاریدها همراه با آب بسیاری از ویژگی های عملکردی و کاربردی مواد غذایی از جمله بافت را کنترل می کنند. پلی ساکاریدهای محلول در آب و پلی ساکاریدهای اصلاح شده در صنعت مواد غذایی و دیگر کاربردهای صنعتی استفاده می شوند. به طور مثال صمغ ها یا هیدروکلئیدها به عنوان پودر در اندازه ذرات مختلف به فروش می رسد (Bemiller and Whistler, 1996).

• خواص رئولوژیکی محلول های پلی ساکارید

خواص رئولوژی یک محلول پلی ساکارید به طور مستقیم به خواص مولکولی ترکیب آن، وزن مولکولی، شاخه یا ساختار خطی، تغییراتی که در طول جداسازی، خالص سازی رخ می دهد، غلظت و همچنین تعاملات بین مولکولی و درون مولکولی و تعامل با یک حلال (به عنوان مثال، آب) بستگی دارد. اندازه گیری خواص ویسکوالاستیک و رفتار جریان می تواند اطلاعات مربوط به تشکیل شبکه و گرایش های تجمع پلیمر فراهم کند. محلول های پلی ساکارید در غلظتی زیر غلظت بحرانی به طور معمول رفتار نیوتنی نشان می دهند. با این حال، در بالاتر از غلظت بحرانی، رفتار غیر نیوتنی مشاهده می شود. توضیح رابطه بین استنتاج بافت مواد غذایی و ساختار مواد غذایی برای تولیدکنندگان مواد غذایی که مایل به تولید بافت غذایی مورد توجه هستند، حائز اهمیت است. با این حال روش رئولوژیکی، محدودیت های خاصی در ارزیابی شرایط واقعی دارد؛ برای مثال ارزیابی خواص رئولوژی تغییر شکل کوچک به سختی برای آزمون های حسی قابل اجرا است. داده های رئولوژیکی نسبت به جریان، تغییر شکل و تجزیه مواد در معرض تنش می تواند مقداری به رفتار مواد غذایی در طول پردازش دهانی و ادراک حسی مواد غذایی

مرتبط باشد. مطالعات رابطه بین خواص رئولوژیکی و حسی توسط گروه شرمین^۱ آغاز شد و آنها به این نتیجه رسیدند که در طول مصرف غذاهای بسیار چسبناک تنش نسبت به افزایش ویسکوزیته افزایش می‌یابد (Venugopal, 2011).

جدول ۱-۲: عوامل تعیین عملکرد پلی‌ساکارید در سیستم‌های غذایی (Venugopal, 2011).

عوامل تعیین‌کننده

تداخلات (افزودنی، آنتاگونیستیک یا سینرژستیک) با دیگر ترکیبات غذایی

مانند برهمکنش پروتئین‌ها با سایر پلی‌ساکاریدها

اثر فاکتورهای دیگر مانند pH، دما، کاتیون‌ها، فشار

اثر فرآیند تولید مانند سرد کردن، خرد کردن، خشک کردن

خواص کامپوزیت‌های پیچیده در ساختار نهایی

تأثیر پلی‌ساکارید در بافت نهایی، دو فاز شدن، عطر، طعم، و ثبات کلی مواد غذایی

۱-۳- کاربرد پلی‌ساکاریدها

تولید تجاری پلی‌ساکاریدها طی پنجاه سال اخیر گسترش یافته است و از آنجا که این دسته از مواد تجدیدپذیر و سازگار با محیط‌زیستند، این روند به احتمال زیاد در آینده رو به افزایش خواهد بود. پلی‌ساکاریدها در بخش گسترده‌ای از صنعت از جمله صنایع مواد غذایی، لوازم آرایشی، رنگ‌ها، منسوجات و مواد شیمیایی کاربرد دارند و به‌طور روزافزون در صنعت داروسازی و محصولات پزشکی به کار گرفته می‌شوند (Lapasin and Pricl, 1995). تولید مواد غذایی کارخانه‌ای در پاسخ به افزایش تقاضا برای غذاهای فرآوری شده از منابع گیاهی و حیوانی، پیچیده شده است که نتیجه‌ی گسترش جهانی شدن و تغییر در شیوه زندگی عموم مردم در سراسر جهان است. استفاده از پلی‌ساکاریدها به‌عنوان

^۱ Sherman

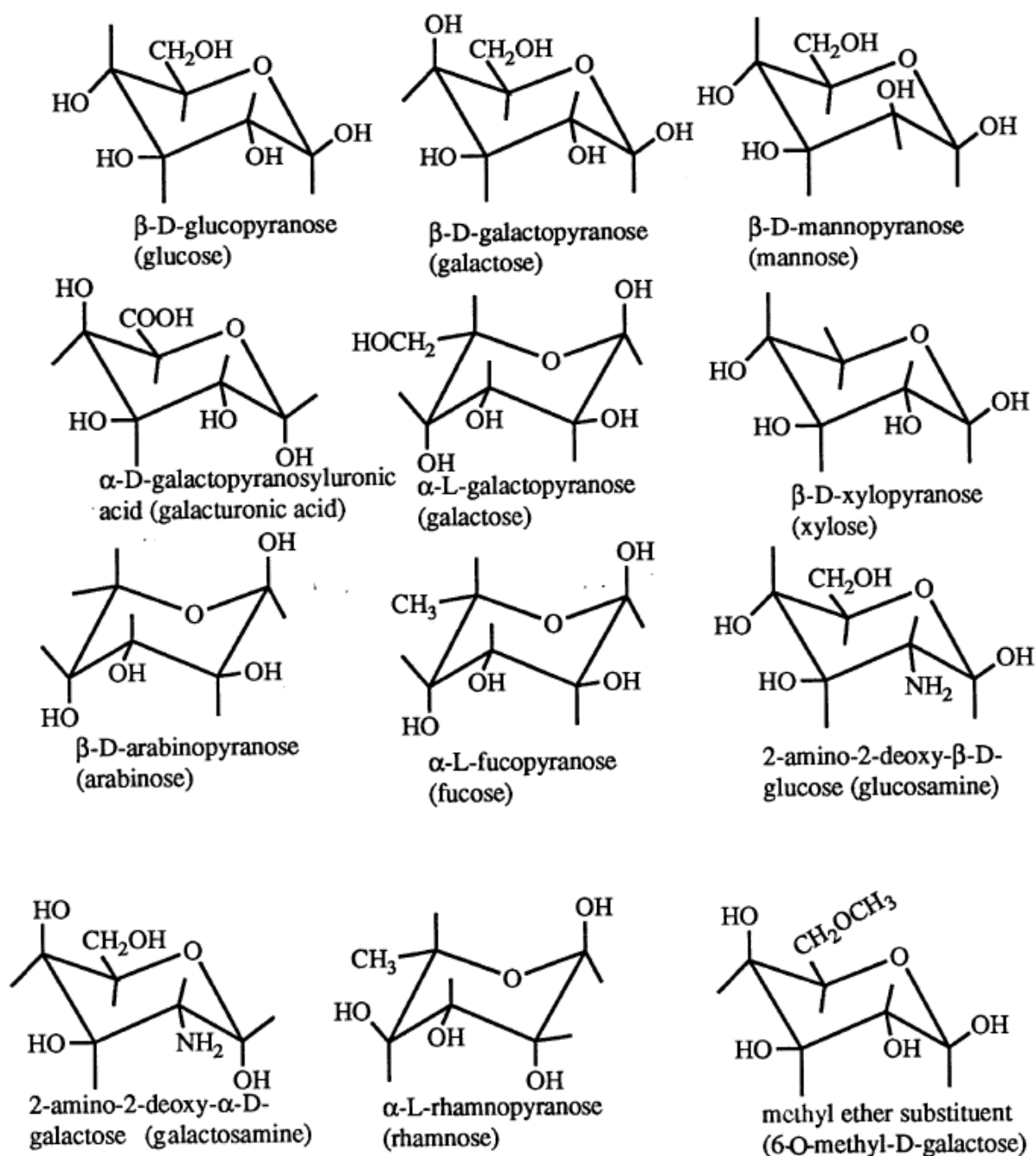
هیدروکلوئیدها در توسعه تولیدات غذایی برای بهره‌مندی از خواص حسی، حیاتی است (Venugopal, 2011).

اغلب پلی‌ساکاریدهای مواد غذایی به‌عنوان پلی‌ساکاریدهای محلول در آب طبقه‌بندی می‌شوند که به‌آسانی در محلول‌های آبی گرم یا سرد حل‌شده و یا پراکنده می‌شوند. پلی‌ساکاریدهای محلول در آب جهت کنترل خواص عملکردی و یا ایجاد بافت مطلوب مواد غذایی به‌طور طبیعی وجود دارند و یا عمداً اضافه می‌شوند. مهم‌ترین خواص عملکردی پلی‌ساکاریدهای مواد غذایی ظرفیت نگهداری آب و افزایش ویسکوزیته است. پلی‌ساکارید می‌تواند ویسکوزیته محلول با غلظت نسبتاً پایین را به‌طور چشمگیری افزایش دهد. از این خاصیت ویژه در مواد غذایی مایع و نیمه جامد استفاده می‌شود. پلی‌ساکاریدها به‌عنوان تغلیظ‌کننده، امولسیفایر، جلوگیری از سینرسیس، افزایش ظرفیت نگهداری آب کاربرد زیادی دارند. توانایی ژلاتینه شدن به این مواد اجازه می‌دهد که در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی فراوری‌شده مانند مربا، ژل، سس سالاد و محصولات غذایی منجمد لبنی استفاده شوند. این ترکیبات تشکیل بلور یخ در مواد غذایی را کنترل می‌کنند و همچنین تأمین‌کننده‌ی خواص حسی به‌عنوان جایگزینی برای چربی در محصولات مختلف هستند. باوجود خواص مطلوب و قابلیت‌های فراوانی که پلی‌ساکاریدها دارند، در حال حاضر استفاده از آن‌ها در مواد غذایی فراوری‌شده احتمالاً در حدود ۱۰٪ از کل مجموع کاربردها است. پلی‌ساکاریدهای عمده‌ای که در صنعت غذایی استفاده می‌شوند عمدتاً از گیاهان و جلبک‌ها مشتق شده‌اند. تمام خواص عملکردی پلی‌ساکاریدهای مواد غذایی وابسته به ساختار، وزن مولکولی و غلظت پلی‌ساکارید است. در جدول ۱-۳ پیوند گلیکوزیدی در برخی از پلی‌ساکاریدها و منابع آن‌ها آمده است (Venugopal, 2011; Bemiller and Whistler, 1996).

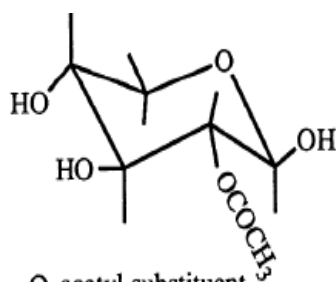
جدول ۱-۳: پیوند گلیکوزیدی در برخی از پلی ساکاریدها و منبع آن‌ها (Venugopal, 2011).

پلی ساکارید	پیوند گلیکوزیدی	منبع
آمیلوز	(۱→۴) (خطی)	گیاه
آمیلوپکتین	(۱→۴)، (۱→۶) (منشعب)	گیاه
گلیکوژن	(۱→۴)، (۱→۶) (منشعب)	پستانداران
سلولز	(۱→۴) (خطی)	دیواره سلولی گیاهان
لامینارین	(۱→۳) (خطی)	جلبک دریایی
کاراگینان	(۱→۳)، (۱→۴)	جلبک دریایی
زانتان	(۱→۴)، با انشعاب در C ₃	میکروارگانیسم
		(باکتری زانتوموناس)
دکستران	(۱→۶)، با انشعاب در (۱→۳) و	میکروارگانیسم (باکتری
گاهی اوقات در	(۱→۴) یا (۱→۲)	استرپتوکوکوس لاکتوس (کمونوستوک)
بدون نام	(۱→۳)، (۱→۶) (منشعب)	مخمر، قارچ

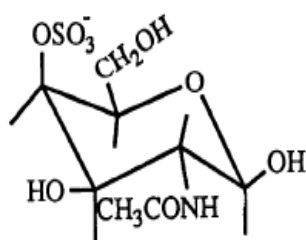
شکل ۱-۲: برخی از مونوساکاریدهای مهم موجود در ساختار پلی ساکاریدها (Lapasin and Pricl, 1995).



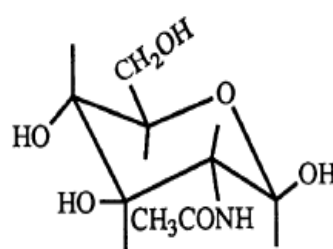
شکل ۲-۱: برخی از مونوساکاریدهای مهم موجود در ساختار پلی ساکاریدها (ادامه).



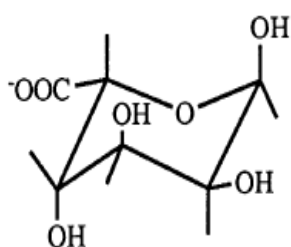
O-acetyl substituent
(2-O-acetyl- β -D-xylose)



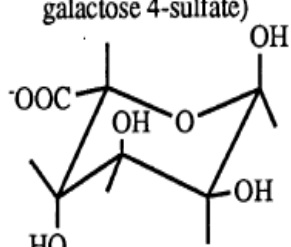
O-sulfate & N-acetyl subs
(2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactose 4-sulfate)



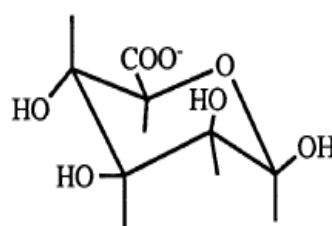
2-acetamido-2 deoxy- β -D-glucose (N-acetylglucosamine)



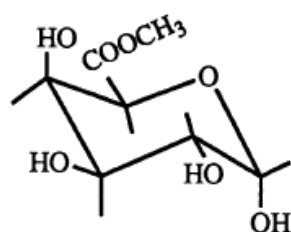
α -L-idopyranosyluronate
(iduronate)



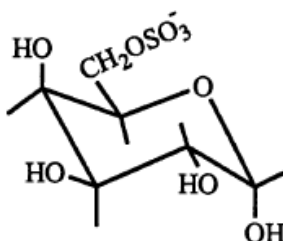
α -L-gulopyranosyluronate
(guluronate)



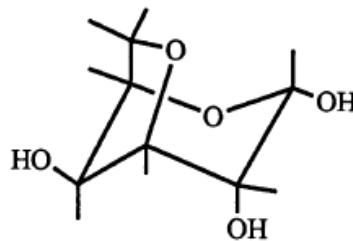
β -D-mannopyranosyluronate
(mannuronate)



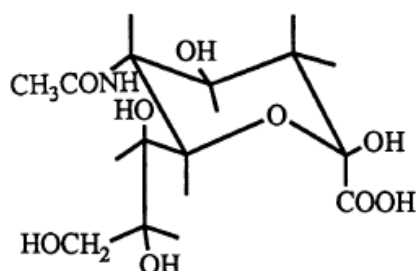
methyl ester
(methyl galacturonate)



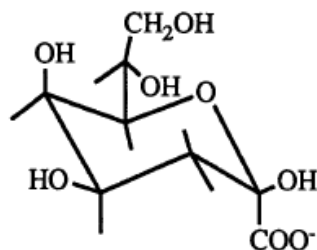
α -D-galactopyranose
6-sulfate



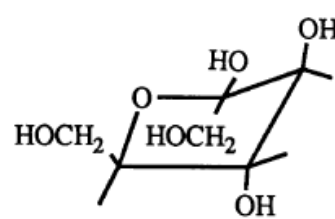
3,6-anhydro- α -D-galactopyranose
(3,6-anhydrogalactose)



N-acetylneuraminic acid
(5-acetamido-3,5 dideoxy-D-glycero- α -D-galactononulopyranosonic acid)

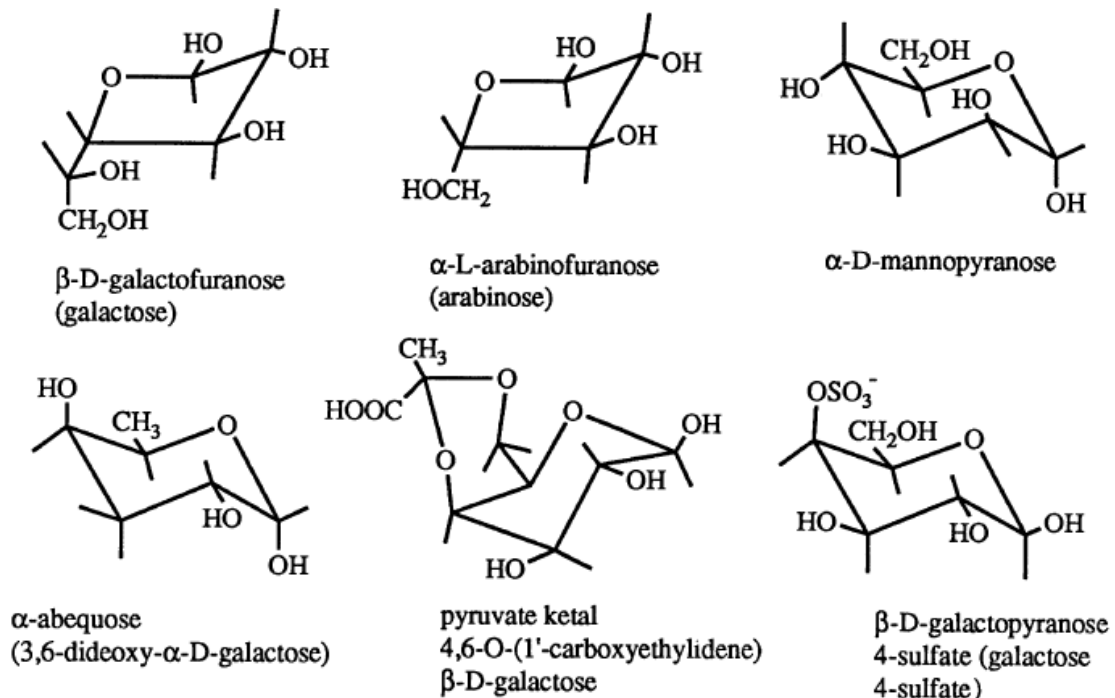


2-keto-3 deoxy- β -D-manno-octonic acid (2-keto-3deoxy-octonic acid or "KDO")



β -D-fructofuranose
(fructose)

شکل ۱-۲: برخی از مونوساکاریدهای مهم موجود در ساختار پلی ساکاریدها (ادامه).



۱-۲-۲-استخراج

استخراج اولین مرحله اساسی را در تحقیقات گیاهان دارویی تشکیل می‌دهد و آماده‌سازی عصاره‌ها از گیاهان، نقطه شروعی برای جداسازی و خالص‌سازی اجزای شیمیایی حاضر در گیاهان است (Mandal et al., 2007). چندین روش برای استخراج پلی ساکاریدها از مواد گیاهی در دسترس است، اما روش کلی برای این کار وجود ندارد و با توجه به پیچیدگی‌های ساختاری و تنوع طبیعی پلی ساکاریدها در گیاهان به گونه‌ها، ساختمان، توسعه‌ی مراحل، و شرایط رشد بستگی دارد (Andersson, Westerlund and Aman, 2006).

۱-۲-۱-انتخاب حلال

مواد مؤثره متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در گیاهان وجود دارند و پس از استخراج و خالص‌سازی می‌توانند در فراورده‌های دارویی، آرایشی و بهداشتی، غذایی و صنعتی کاربرد داشته باشند. اسانس‌ها،

عصاره‌ها و رنگ‌های طبیعی مثال‌هایی از مواد مؤثره هستند. روش‌های مختلف استخراج به‌طور وسیعی به‌منظور به دست آوردن چنین ترکیب‌های طبیعی با ارزش بررسی شدند. روش‌های سنتی استخراج، نیاز به صرف زمان طولانی و مقادیر زیادی حلال دارند، بنابراین نیاز به روش‌های استخراج جدید با مدت استخراج کوتاه‌تر، در سالهای اخیر منجر به توسعه روش‌هایی با مصرف حلال آلی کمتر به همراه ایجاد آلودگی کمتر شده است (Mandal et al., 2007).

قندها با دارا بودن چندین گروه هیدروکسیل در آب و الکل بسیار محلول‌اند و در حلال‌های غیرقطبی حلالیت کمی دارند. سلولز نیز بسیار پایدار بوده و میکروفیبریل‌های سلولز بسیار منظم هستند. واکنش‌های سه بعدی بین آن‌ها در کریستال بسیار گسترده است و در نتیجه شکست آن‌ها بسیار مشکل است. میکروکریستال سلولز بواسطه ساخت مشتقات شیمیایی در آب حل می‌شود (متیل سلولز، کربوکسی متیل سلولز، هیدروکسی پروپیل، هیدروکسی متیل سلولز). در تولید این هیدروکلوئیدها، اولین مرحله انحلال جزئی سلولز بوسیله تیمار با باز قوی است که در شکستن پیوندهای هیدروژنی بسیار مؤثر است. با این حال برای استخراج پلی‌ساکاریدهای خنثی آب معمولاً اولین انتخاب است (Wrolstad, 2012; Cui, 2005).

۱-۲-۲- روش‌های استخراج

استخراج پلی‌ساکاریدها اغلب نیازمند تکنیک‌های مختلف است. تهیه عصاره‌های آبی پلی‌ساکاریدها گام اولیه در استخراج پلی‌ساکاریدها از گیاهان است (Biliaderis and Izydorczyk, 2006). آماده‌سازی نمونه قبل از مراحل مختلف استخراج در روش جداسازی از اهمیت حیاتی برخوردار است، برای مثال تأثیر فعالیت آنزیم باید به حداقل برسد و از تخریب میکروبی اجتناب شود. آنزیم‌های متصل به دیواره سلولی، ممکن است فعال شده و به دلیل آسیب بافت اجتناب‌ناپذیر در طول آماده‌سازی نمونه، باعث تخریب پلی‌ساکارید شوند؛ بنابراین، اقدامات مناسبی شامل حذف آب در اسرع وقت از گیاهان تازه برداشت‌شده یا همگن‌سازی در اتانول و خشک‌کردن در حدود 40°C اتخاذ شود، زیرا خشک‌کردن در

دمای بالا، ممکن است عامل تخریب هیدرولیتیک پلی ساکارید یا ایجاد واکنش میلارد شود (Andersson, Westerlund and Aman 2006).

ترکیبات دیواره سلولی را می توان با بسیاری از حلال ها استخراج کرد، اما آب در دماهای مختلف معمولاً انتخاب اول برای استخراج پلی ساکاریدهای خنثی است. به طور معمول، با افزایش دمای حلال آبی استخراج پلی ساکاریدها افزایش می یابد. پلی ساکاریدهای اسیدی مانند پکتین، توسط کمپلکس دو ظرفیتی محکم با یون های فلزی و عوامل تشکیل دهنده کمپلکس مانند اگزالات آمونیوم^۱، هگزامتافسفات سدیم^۲، اتیل دی آمین تتراستیک اسید^۳ حل می شوند. از محلول های اسیدی معمولاً برای استخراج پلی ساکاریدها به دلیل خطر هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی اجتناب می شود. محلول های قلیایی به طور گسترده برای استخراج پلی ساکاریدهای دیواره سلولی استفاده می شود. تصور بر این است که تحت شرایط قلیایی، پیوندهای استر و کووالانسی و غیر کووالانسی شکسته و در ابتدا پلی ساکارید غیرقابل استخراج از شبکه پیچیده ای از دیواره های سلول خارج می شود. موم و چربی را می توان با کلروفرم، بنزن، و اتانول استخراج کرد (Heinze, 2005).

استخراج بتاگلوکان وابسته به پارامترهای استخراج مانند pH، قدرت یونی حلال، دما، زمان استخراج، پیش تیمار (حرارت و خشک کردن)، و حضور آنزیم ها (درونزا یا تولید شده توسط میکروارگانیسم ها) است. بنابراین با تغییر هر یک از این پارامترها تفاوت قابل توجهی در استخراج ممکن است صورت گیرد. الکل گرم (۸۰ تا ۹۰٪ اتانول) اغلب به عنوان اولین گام برای جداسازی بتاگلوکان غلات جهت غیرفعال کردن آنزیم های درون سلولی حاضر استفاده می شود، همچنین برای حذف ناخالصی هایی مانند چربی، قند، اسیدهای آمینه، پروتئین های کوچک، و برخی ترکیبات فنولیک اثر مشابه دارد. چربی زدایی با ایزوپروپانول^۴ داغ در گذشته به عنوان اولین مرحله جداسازی بتاگلوکان در جو دو سر استفاده شد. در

^۱ Ammonium oxalate

^۲ Hexametaphosphate sodium

^۳ EDTA

^۴ Isopropanol

بسیاری از مطالعات اولیه، بتاگلوکان جو دو سر با آب در دماهای °C ۴۷ تا ۵۲ در زیر دمای ژلاتینه شدن استخراج می‌شود. برای جداسازی بتاگلوکان، درجه حرارت °C ۴۵ به‌عنوان استخراج بهینه پیشنهاد شده است (Biliaderis and Izydorczyk, 2006).

مواد پکتیکی با محلول‌های آبی حاوی عوامل چلات کننده، مانند اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^۱ یا اگزالات آمونیوم^۲ استخراج می‌شوند. تأثیر عوامل چلات کننده به‌صورت توانایی ترکیب با کلسیم و منیزیم است. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که استخراج پکتین با ۱،۲ سیکلو هگزان دی آمین تترا استیک اسید^۳ گاهی اوقات بهتر است زیرا تخریب پکتین کمتر می‌باشد. این پلی ساکارید غیر قابل حل در آب ممکن است با کربنات سدیم^۴ رقیق یا هیدروکسید سدیم^۵ استخراج شود. پلی ساکاریدهای دیگر غیر سلولزی مانند آرابینوزایلان‌ها، زایلوگلوکان‌ها و گلوکومانان‌ها ترجیحاً با استفاده از محلول‌های آبی از مواد قلیایی حاوی بروهیدرات سدیم^۶ استخراج می‌شوند. اگر لیگنین در بافت گیاهی وجود داشته باشد، جهت لیگنین زدایی^۷، به سدیم کلرید^۸ و اسید استیک^۹ قبل از استخراج پلی ساکارید با محلول قلیایی نیاز است. با این حال ممکن است در طول مرحله حذف لیگنین، برخی از پروتئین‌ها و پلی ساکاریدهای دیواره سلولی را به دلیل واکنش‌های انحلال و تخریب از دست داد (Andersson, Westerlund and Aman 2006).

۱-۳- خالص سازی

ترکیب و وزن مولکولی پلی ساکارید بسته به منبع و شرایط استفاده شده برای جداسازی، آماده سازی و تعیین خواص فیزیکی و کارکردی آن‌ها متفاوت است. پلی ساکاریدها از عصاره بیولوژیکی مشتق شده از بافت‌های گیاهی، حیوانی یا از میکروارگانیسم‌ها جدا می‌شوند. پلی ساکارید خارج سلولی حاصل از

^۱ Ethylenediaminetetraacetic acid

^۲ Ammonium oxalate

^۳ Cyclohexane diamine tetra acetic acid (CDTA)

^۴ Na₂CO₃

^۵ NaOH

^۶ Sodium borohydrate

^۷ Delignification

^۸ Sodium chloride

^۹ Acetic acid

میکروارگانسیم‌ها توسط تخمیر از ارگانسیم موردنظر جدا شده و عصاره خام از مخلوط پروتئین، پلی ساکارید، و متابولیت‌های ثانویه تشکیل شده است. همچنین تخلیص برای به دست آوردن محصولات مناسب برای مصرف انسان یا حیوان یا برای استفاده در داروسازی لازم است (Venugopal, 2011).

روش‌های تخلیص تفاوت زیادی دارند که به دلیل تغییرات گسترده ایجاد شده در خواص فیزیکی و شیمیایی پلی ساکارید است. لازم به ذکر است که خواص و ساختار پلی ساکارید در طول استخراج، فرکشن‌گیری^۱ و سایر روش‌های استخراج از مواد گیاه تغییر می‌کند. در صورتی که تنها بخش کوچکی از پلی ساکارید جدا شود این بخش ممکن است نماینده ساختار پلی ساکارید در ماده اولیه باشد. وقتی پلی ساکارید خالص باشد، می‌تواند برای آنالیز ساختاری توسط اغلب روش‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. خلوص پلی ساکارید با روش‌های مختلفی تایید می‌شود. ثبات ترکیب مونوساکارید و نسبت قندها پس از مراحل تکرار تخلیص نشان‌دهنده خلوص پلی ساکارید است. همچنین، مشخصات شستشو (تعداد پیک، اندازه و تقارن پیک) می‌تواند نشان‌دهنده خلوص پلی ساکارید باشد (Andersson, Westerlund and Aman 2006; Cui, 2005).

شناسایی پلیمرهای کربوهیدراتی، اول از همه به جداسازی و خالص‌سازی پلیمر از منبع اصلی آن بستگی دارد. ماهیت پلی ساکارید، به‌طور خاص، تحت تأثیر ترکیبات شیمیایی، ساختار مولکولی، وزن و حلالیت آن‌ها قرار می‌گیرد. همچنین پلی ساکاریدهای گیاهی، از طریق پیوندهای کووالانسی (فنولیک، گلیکوزیدی، پیوندهای اتر و استر) با ترکیبات گیاهی مثل لیگنین، پروتئین، و سلولز شناخته می‌شوند (Andersson, Westerlund and Aman 2006).

۱-۳-۱- حذف پروتئین‌ها

پلی ساکارید استخراج شده از مواد گیاهی یا مواد غذایی معمولاً قبل از آنالیز ساختاری تخلیص می‌شوند. گام اول از توصیف یک پلی ساکارید، تعیین خلوص آن است که توسط ترکیب شیمیایی آن مثل قند کل، سطح اسید اورونیک، پروتئین، خاکستر و رطوبت منعکس می‌شود (Cui, 2005). در بسیاری از

^۱ Fractionations

موارد، مقدار نیتروژن نشان‌دهنده سطح آلودگی با پروتئین است. این روش برای پلی‌ساکاریدهایی مانند بتاگلوکان، آرابینوزایلان، سلولز، صمغ زانتان، ژلان، کاراگینان‌ها، و آلژینات، که باید حداقل سطح آلودگی پروتئین را داشته باشد به خوبی عمل می‌کنند. این روش برای پلی‌ساکاریدهایی که حاوی پیوندهای پپتیدی کووالانسی است مانند صمغ عربی یا آرابینوگالاکتان مصداق ندارد (Venugopal, 2011).

پروتئین‌ها توسط آنزیم‌های پروتئاز قلیایی باکتریایی یا پاپائین یا توسط ترسیب با اسید تری‌کلرواستیک^۱، اسید سولفوسالسیک^۲، واسرشتن توسط کلروفرم (روش سواگ^۳)، جذب پروتئین بر روی خاک‌های رس و همچنین عبور محلول پلی‌ساکاریدی از رزین‌های تبادل کننده کاتیونی از محلول پلی‌ساکاریدی جدا می‌شوند. در روش سواگ پروتئین در حد واسط کلروفرم-آب واسرشت می‌شود و به‌صورت لایه ژل مانند در می‌آید (Cui, 2005).

۱-۳-۲- حذف سایر ناخالصی‌ها

حذف سایر ناخالصی‌ها از پلیمرهای کربوهیدراتی بوسیله هضم ویژه ناخالصی‌ها با آنزیم‌های هیدرولیتیک مناسب یا روش‌های کروماتوگرافی و شیمیایی انجام می‌گیرد. البته در روش استفاده از آنزیم بایستی از آنزیم‌های بسیار خاص که فاقد فعالیت‌های جانبی باشند استفاده شود. کروماتوگرافی تبادل یون^۴ با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل سلولز^۵ برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای خنثی و اسیدی بسیار متداول و اختصاصی است. در این نوع کروماتوگرافی، پلی‌ساکاریدهای خنثی بدون برقراری اتصال از داخل ستون عبور می‌کنند درحالی‌که پلی‌ساکاریدهای اسیدی به‌خاطر وجود بارهای منفی در داخل ستون باقی مانده و درنهایت توسط بافرها، با افزایش قدرت یونی یا pH، از ستون شسته و خارج می‌شوند (Cui, 2005).

^۱ Trichloroacetic acid (TCA)

^۲ Sulfosalicylic acid

^۳ Sevag

^۴ Ion exchange chromatography

^۵ Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose

سوالو^۱ و لو^۲ در سال ۱۹۹۳ از تلفیق کروماتوگرافی کاغذ^۳ با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۴، کروماتوگرافی گاز-مایع^۵ و رزونانس مغناطیسی هسته در شناسایی الیگوساکاریدهای ناچیز در نمونه تجاری شربت اینورت چغندر بهره گرفتند. همچنین به منظور اندازه گیری الیگوساکاریدهای جدا شده چه به صورت احیا شونده و چه به صورت غیر احیا شونده از معرف اسید دی نیترو سالیسیلیک^۶ و برای اندازه گیری قندهای کتوزی از معرف آنترون^۷ استفاده کردند. کروماتوگرافی کاغذ و کروماتوگرافی لایه نازک^۸ به طور گسترده به منظور آنالیز قندها در دهه ۱۹۵۰ تا ۱۹۶۰ مورد استفاده قرار گرفت. اگرچه امروزه در بسیاری از آزمایشگاه ها روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جایگزین این روش شده است ولی با این وجود یک تکنیک سودمند محسوب می شود (Wrolstad, 2012).

۱-۴- ترسیب

حلالیت پلی ساکارید در محلول آبی بسته به عوامل مختلف تغییر می کند. الکل یا ید، مس، باریم، و نمک آمونیوم برای کاهش حلالیت و ته نشین کردن استفاده می شود. برای مثال ترسیب پلی ساکارید در اتانول ۹۰٪ برای به دست آوردن آرابینوزایلان در چاودار و آرد گندم استفاده می شود. در مطالعه ویژگی های ساختاری این پلی ساکارید ترسیب مجدد با اتانول برای استخراج آرابینوزایلان از آرد گندم مورد استفاده قرار گرفت، و آرابینوزایلان در چاودار با استفاده از ترسیب با سولفات آمونیوم جدا شده است. پلی ساکاریدهای همی سلولزی خطی و شاخه ای در خانواده های لگومیناسه و گرامینه به وسیله تفکیک توانایی ترکیب با ید از هم تفکیک می شوند. گلوکومانان و مانان ها با هیدروکسید باریم ترسیب می شوند که احتمالاً به علت واکنش با گروه های ۲،۳-سیس هیدروکسیل در مانوزهای آزاد است. جدایی

^۱ Swallow

^۲ Low

^۳ Paper Chromatography

^۴ High-performance liquid chromatography-(HPLC)

^۵ Gas liquid chromatography-(GLC)

^۶ Dinitrosalicylic acid

^۷ Anthrone

^۸ Thin Layer Chromatography- (TLC)

پلی ساکاریدهای اسیدی (پکتیکی) از خنثی با استفاده از نمک‌های آمونیوم انجام می‌شود (Andersson, 2006). (Westerlund and Aman 2006).

۱-۵- شناخت و تشخیص ساختمان مولکولی

شناسایی کربوهیدرات کل در محیط‌زیست و نمونه‌های مواد غذایی معمولاً نیاز به روش هیدرولیز شیمیایی اولیه برای تبدیل پلی‌ساکارید به مونوساکاریدهای سازنده قبل از تشخیص توسط رنگ‌سنجی^۱ یا تکنیک‌های کروماتوگرافی دارد. روش‌های کروماتوگرافی جهت رفع مواد مزاحم و نگهداری شواهد حاصله‌ای است که در شناسایی سودمند هستند. روش‌های کروماتوگرافی، سریع، حساس و مناسب آنالیزهای روتین و روزمره هستند (Wrolstad, 2012; Venugopal, 2011).

روش هیدرولیز بر اساس استفاده از فراصوت در دمای اتاق برای تعیین کربوهیدرات کل مفید است. آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده، آنالیز متیلاسیون، هیدرولیز گلیکوزیدی، طیف‌سنجی جرمی^۲ و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته‌ای^۳ برخی از روش‌های آنالیز شناخت و تشخیص ساختمان مولکول هستند (Venugopal, 2011). روش‌هایی که برای تعیین کربوهیدرات‌ها به کار گرفته شده است تمام تکنیک‌های کروماتوگرافی است. روش‌های مفید کروماتوگرافی مایع-گازی (GLC) و کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) به علت مزایای خود با توجه به راندمان جداسازی، تعیین مقدار و سرعت آنالیز عمدتاً جایگزین روش‌های قبلی کروماتوگرافی کاغذی و کروماتوگرافی لایه‌نازک برای تعیین مونو و دی ساکاریدها شده است. کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) ممکن است روش بسیار کارآمدی برای آنالیز برخی از نمونه‌ها باشد. درواقع استفاده از این روش توسط جادهو^۴ و همکاران استفاده شد که گلوکز، فروکتوز و ساکاروز را در آب نیشکر به وسیله TLC با عملکرد بالا تعیین کردند. گزارش‌های بسیاری در توصیف تعیین مونو و دی ساکاریدها انجام شده است. از ۱۵ سال گذشته، HPLC به‌طور واضح جایگزین GLC، به‌عنوان متداول‌ترین روش، شد. درواقع ادامه پیشرفت در روش HPLC (در درجه اول با

^۱ Colorimetric

^۲ Mass spectrometry (MS)

^۳ Nuclear magnetic resonance (NMR)

^۴ Jadhav

پیشرفت‌های عمده در تشخیص) است. ممکن است پیشنهاد شود که روش‌های GLC منسوخ شود، اما در عمل چنین نیست. اگرچه روش HPLC روش انتخابی برای بسیاری از آزمایشات است، روش GLC همچنان در آنالیز کربوهیدرات‌ها استفاده می‌شود. دو روش پیشنهادی انتخاب‌شده متفاوت با توجه به تصمیم و توانایی می‌تواند به‌عنوان جایگزین در نظر گرفته شود که در آن تفکیک‌پذیری بسیار بالا موردنیاز است. ستون موئین GLC دامنه قابل‌توجهی را ارائه می‌دهد (Andersson, Westerlund and Aman, 2006). بعد از تخلیص پلی‌ساکارید، می‌توان آن را برای آنالیز ساختاری توسط بسیاری از روش‌های مختلف مورد استفاده قرارداد. به‌منظور تعیین ساختار اولیه پلی‌ساکارید چند ویژگی باید روشن شود که در ادامه آورده شده است.

۱-۵-۱- روش‌های شیمیایی

۱-۱-۵-۱- تعیین وزن مولکولی

اولتراسانتریفیوژ^۱، سانتریفیوژ غشایی و ژل فیلتراسیون روش‌های خالص‌سازی دیگری هستند که بر اساس تفاوت‌ها به خصوص تفاوت در وزن مولکولی^۲ و ترکیب پلی‌ساکاریدها بنا شده‌اند. این روش‌ها و روش‌های دیگر نظیر پراکنش نور نیز برای تعیین وزن مولکولی کاربرد دارند. آرابینوزایلان محلول در آب و پپتید آرابینو گالاکتان که هر دو در خمیر گندم وجود دارند، بر اساس تفاوت زیاد در وزن مولکولی، به طور نسبی با ژل فیلتراسیون روی ستون سفاروزی جدا می‌شوند. ضریب انتشار توسط طیف سنجی NMR (DOSY^۳) می‌تواند مخلوط هموپلی‌ساکاریدها با وزن مولکولی متفاوت را به سادگی از یکدیگر جدا کند در حالی که به عنوان یک ابزار همه کاره برای دستیابی به یک برآورد ساده از وزن مولکولی پلی‌ساکارید محسوب نمی‌شود (Andersson, Westerlund and Aman 2006; Viel, 2003).

روش‌های گوناگونی جهت تعیین وزن مولکولی پلی‌ساکاریدها وجود دارد. امروزه از روش‌هایی مانند کروماتوگرافی ژل تراوا (غربال مولکولی)، سانتریفیوژ کردن فوق‌سریع و فراپالایش جهت تعیین وزن

^۱ Ultracentrifugation

^۲ Ultrafiltration membranes

^۳ Diffusion-ordered NMR spectroscopy

مولکولی پلی ساکاریدها استفاده می‌شود. زمانی که وزن مولکولی پلی ساکارید بالا باشد می‌توان از روش سانتریفیوژ کردن فوق‌سریع استفاده کرد (Muralikrishna and Rao, 2007).

۱-۵-۱-۲- ترکیب مونوساکاریدهای سازنده

تعیین مونو و دی ساکاریدها از رایج‌ترین آنالیزهای مورد نیاز در آزمایشگاه‌های آنالیز مواد غذایی است و کاربرد قابل توجهی در مطالعات تغذیه و بیوشیمی دارد. تنوع تولید محصولات غذایی و نوشیدنی توسط تولیدکنندگان مواد غذایی همچنان ادامه دارد. این تنوع همراه با انتظارات مطرح‌شده از کیفیت و سازگاری مصرف‌کننده است، که یک نیاز به روش‌های تحلیلی برای ارائه اطلاعات خاص در ترکیب با هر دو مواد اولیه و محصولات نهایی ایجاد شده است. در مورد دوم مانند آنالیز که ممکن است با قوانین مربوط به اطلاعات طبقه‌بندی شده تغذیه رانده شود، به‌طور کلی توسط افزایش فعالیت تحقیقاتی در مورد رژیم غذایی و اهمیت غذایی کربوهیدرات‌ها تقویت شده است. آنالیز مونو و دی ساکاریدها برای مواد غذایی ساده، غذاهای فراوری شده پیچیده و اجزا یا ترکیباتی که در مطالعات تغذیه‌ای جدا شده‌اند، باید قابل اجرا باشد. آنالیز مونو ساکاریدها اغلب برای تعیین نهایی ترکیبات پلیمری کربوهیدرات‌ها، به کار گرفته شده است. اگرچه ممکن است در حال حاضر روش‌های کروماتوگرافی استفاده شود اما روش‌های انتخاب فیزیکی، شیمیایی و روش‌های بیوشیمیایی هنوز نقش مهمی در تجزیه و تحلیل کربوهیدرات‌ها دارد. در گذشته جهت تعیین پیکربندی ساختار اندازه‌گیری چرخش نوری و اکسایش اختصاصی قندها توسط آنزیم‌ها کاربرد داشتند که این روش نیازمند مونوساکاریدهایی با خلوص بالا و مقدار قابل توجه و همچنین آنزیم‌های خاصی هستند که همیشه در دسترس نیستند اما امروزه پیکربندی به راحتی با روش‌های GLC مشخص می‌شوند. این روش‌ها مبنی بر آماده سازی بوتیل یا آکتیل گلیکوزیدهای متناظر با استفاده از (-)-۲-بوتانول یا (+)-۲-اکتانول آنانتیومری و به دنبال آن، مقایسه زمان بازداری GLC برای مشتقات مناسب (انواع سیلیس اتر یا استات) است (Folkes and Jordan 2006; Gerwig, 1987).

۱-۵-۱-۲-۱-کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا سریع‌ترین رشد را در بین تمام فنون جداسازی تجزیه‌ای با فروش سالانه میلیارد دلاری داشته است. دلایل این محبوبیت عبارت‌اند از: حساسیت روش، سازگاری آسان آن برای انجام اندازه‌گیری‌های کمی صحیح، مناسب بودن آن برای جداسازی گونه‌های ناپایدار گرمایی و مهم‌تر از همه کاربرد گسترده آن برای موادی که در صنعت، زمینه‌های مختلف علوم و جامعه از اهمیت زیادی برخوردارند. مثال‌هایی از این گونه مواد عبارت‌اند از: اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، هیدروکربن‌ها، کربوهیدرات‌ها، داروها، ترپنوئیدها، حشره‌کش‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، استروئیدها، گونه‌های آلی فلزی و گروهی از مواد گوناگون معدنی. در اوایل ابداع کروماتوگرافی مایع دانشمندان تشخیص دادند که افزایش چشمگیر کارایی ستون را می‌توان با کاهش اندازه ذرات پرکننده انجام داد. با این وجود تا اواخر دهه ۱۹۶۰ فن‌آوری تولید و استفاده از پرکننده‌هایی با قطر ذراتی به کوچکی ۳ تا ۱۰ میکرومتر ابداع نگردیده بود. این فن‌آوری در مقایسه با ستون‌های ساده شیشه‌ای کروماتوگرافی کلاسیک به دستگاه‌های پیچیده‌ای نیاز داشت. نام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اغلب اوقات برای متمایز کردن روش‌های جدیدتر از روش‌های کلاسیک که هنوز هم مورد استفاده گسترده‌ای برای مقاصد تهیه‌ای دارند، به کار می‌رود (سلاجقه، ۱۳۸۹).

در اکثر آزمایشگاه‌ها، HPLC روشی انتخابی مورد استفاده برای آنالیز قندهاست. از جمله مزایای HPLC سریع و کمی بودن آن است و انجام آنالیز در مدت‌زمان حدود ۲۰ دقیقه یا کمتر انجام می‌شود. در بسیاری از کاربردها، آماده‌سازی نمونه مستلزم زمان کوتاهی است. به‌طور معمول شناساگرهای شاخص انکسار^۱ با حساسیتی در حدود ۱ میلی‌گرم مورد استفاده قرار می‌گیرند، از این‌رو شناسایی با UV عملی نیست زیرا امکان تداخل در محدوده پایین UV به هنگام جذب قندها وجود دارد. در بسیاری از نمونه‌های غذایی حساسیت اندازه‌گیری غلظت قندها نظیر آنچه گفته‌شده نیست. یکی از محدودیت‌های شناساگرهای شاخص انکسار این است که در آن شیب شویش نمی‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

^۱ Refractive index

کروماتوگرافی با فاز نرمال همراه با ستون‌های پیوسته آمینی به‌طور گسترده جهت آنالیز قندها استفاده می‌شود. مکانیسم جداسازی بر پایه قدرت پیوندی بین سیس- گلیکول قندها با کلسیم دو بار مثبت ستون استوار است. در الیگوساکاریدها برای این که جرم بیشتری به‌وسیله فاز متحرک به سهولت جابه‌جا شود نخست مورد شویش قرار می‌گیرند. ترتیب شویش وابسته به تعداد و قدرت کمپلکس سیس- گلیکول است. این احتمال که الکل‌های پلی‌هیدریک مارپیچی نظیر سوربیتول، زایلیتول و مانیتول بعداً شسته شوند وجود دارد زیرا چرخش آزاد مولکول مارپیچی اجازه اتصال سیس- گلیکول به کلسیم دو بار مثبت را می‌دهد. قندها همچنین می‌توانند از ستون‌های تبادل آنیون تحت شرایط قلیایی جدا شوند. قندها اسیدهای ضعیفی هستند و در pH بالا آنیون تشکیل خواهند داد. ستون‌های تبادل یون HPLC عمدتاً در اتصال با شناساگرهای الکتروشیمیایی به‌منظور آنالیز مخلوط‌های کمپلکس قندهای مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Wrolstad, 2012).

چهار نوع اصلی کروماتوگرافی که در آن فاز متحرک یک مایع است عبارت‌اند از: کروماتوگرافی تقسیمی، کروماتوگرافی جذب سطحی یا مایع- جامد، کروماتوگرافی ژلی یا اندازه‌طردی. از این‌رو کروماتوگرافی طردی برای مواد حل‌شده‌ای که وزن بالای ۱۰۰۰۰ دارند، اغلب به‌کاربرده می‌شود، اگرچه امروزه می‌توان این بررسی‌ها را با کروماتوگرافی تقسیمی فازمعکوس نیز انجام داد. برای گونه‌های یونی با وزن مولکولی پایین، کروماتوگرافی تبادل یونی کاربرد وسیعی دارد. گونه‌های کوچک قطبی اما نایونی، به بهترین وضع با روش‌های تقسیمی بررسی می‌شود. بعلاوه این روش اغلب برای جاسازی اعضای یکسری همراه مفید است. کروماتوگرافی جذب سطحی اغلب برای جداسازی گونه‌های ناقطبی، ایزومرهای ساختاری و دسته ترکیباتی از قبیل هیدروکربن‌های آلیفاتیک از الکل‌های آلیفاتیک به کار می‌رود (سلاجقه، ۱۳۸۹).

۱-۵-۱-۲- کروماتوگرافی گازی

کروماتوگرافی گاز مایع کاربرد گسترده‌ای در تمام رشته‌های علوم دارد و معمولاً با نام مختصر کروماتوگرافی گازی شناخته می‌شود. کروماتوگرافی گاز مایع بر پایه تقسیم آنالیت^۱ بین یک فاز متحرک

^۱ Analyte

گازی و یک فاز مایع تثبیت شده بر سطح یک جامد بی اثر بنا شده است. مفهوم کروماتوگرافی گاز-مایع اولین بار در سال ۱۹۴۱ توسط مارتین^۱ و سینج^۲ که مبتکر کروماتوگرافی تقسیمی مایع-مایع نیز بودند، پیشنهاد شد با این حال یک دهه از این تاریخ گذشت تا ارزش کروماتوگرافی گاز-مایع به طور تجربی نمایش گذاشته شد. سه سال بعد در سال ۱۹۵۵ اولین دستگاه تجاری کروماتوگرافی گازی وارد بازار شد. تخمین زده می شود امروزه در سرتاسر جهان حدود ۲۰۰۰۰۰ کروماتوگرافی گازی در حال استفاده باشد.

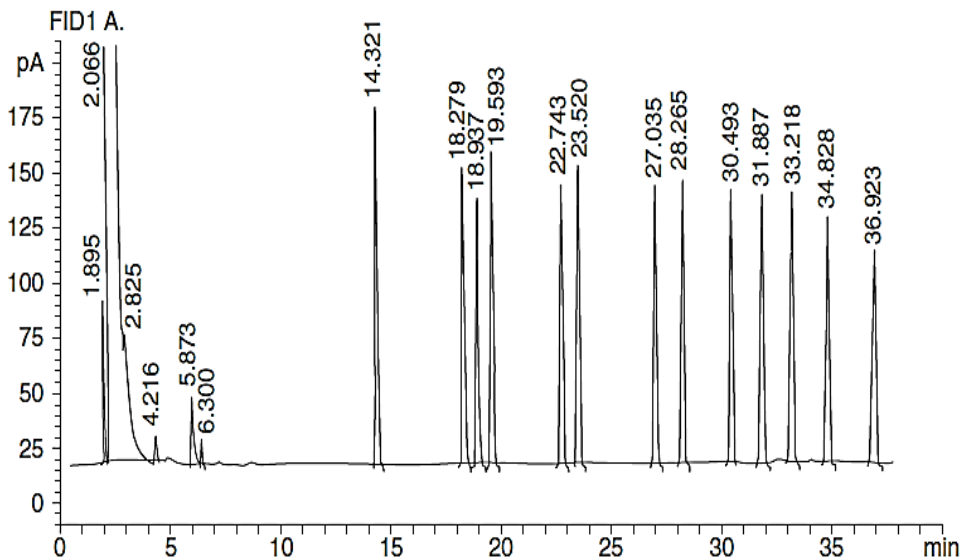
GLC به عنوان وسیله ای برای انجام جداسازی به کار می رود، در این رابطه، برای ترکیبات پیچیده آلی، آلی فلزی و سیستم های زیست شیمیایی که متشکل از گونه های فرار یا گونه هایی هستند که می توانند با مشتق سازی تولید اجسام فرار کنند بی رقیب است و روشی برای تکمیل تجزیه در اختیار می گذارد. در اینجا، زمان یا حجم بازداری برای شناسایی کیفی بکاربرده می شود و ارتفاع یا سطح زیر پیکها اطلاعات کمی در اختیار می گذارد. در کروماتوگرافی گازی نمونه تبخیر و به سرستون کروماتوگرافی تزریق می شود. شویش با جریانی از فاز متحرک گازی بی اثر انجام می شود. برعکس اکثر انواع دیگر کروماتوگرافی، فاز متحرک با مولکول های آنالیت برهمکنش ندارد و فقط به عنوان وسیله ای برای عبور مولکول ها از داخل ستون عمل می کند (سلاجقه، ۱۳۸۹).

قندها موادی غیر فرار هستند لذا قبل از اینکه بتوانند به وسیله کروماتوگرافی گاز-مایع آنالیز شوند نیاز به مشتق سازی دارند. تشکیل استات های آلدیتول روشی است که به طور گسترده در جداسازی، تشخیص و اندازه گیری قندها در پلی ساکاریدها کاربرد دارد. به دنبال هیدرولیز پلی ساکاریدها، قندها با سدیم بروهیدرید به آلدیتول کاهیده می شوند و سپس تمام گروه های هیدروکسیل با استفاده از استیک انیدرید استیله می شوند. از محدودیت های این روش آن است که گلوکز، فروکتوز و سوربیتول به شکل دی

^۱ Martin

^۲ Synge

گلوسیتول هگزا استات و قندهای کتوزی نظیر فروکتوز به شکل دو آلدیتول در خواهند آمد. مشتقات تری متیل سیلیل قندها به وسیله واکنش قندها با هگزا متیل دیسلازان^۱ در حضور هگزان و پیریدین تحت شرایط غیر آبی تشکیل می‌شوند و با حضور آب واکنش به طور کامل انجام نمی‌شود بنابراین قندها و عصاره‌های قندی نیاز به این دارند که به شکل خشک شده باشند. مشتق سازی تری متیل سیلیل برای مخلوط‌های قندی کروماتوگرام پیچیده‌ای نشان می‌دهد از این رو مشتقات استات برای آنالیز پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی ارجحیت دارند. این روش برای شناسایی در اندازه ۲۰ نانوگرم بسیار حساس است. در شکل ۱-۳ کروماتوگرام ۱۳ قند استاندارد نشان داده شده است (Wrolstad, 2012).



شکل ۱-۳: کروماتوگرام ترکیبی استاندارد استات‌های آلدیتول.

اریتریتول تری استات^۲ (پیک ۱۴/۳۲۱)، ۲-دئوکسی ریتول تترا استات^۳ (پیک ۱۸/۲۷۹)، رامنیتول پنتا استات^۴ (پیک ۱۸/۹۳۷)، فاکتیکول پنتا استات^۵ (پیک ۱۹/۵۹۳)، ربیتول پنتا استات^۶ (پیک ۲۲/۷۴۳)،

^۱ Hexamethyldisilazane (HMDS)

^۲ Erythritol triacetate

^۳ 2-deoxyribose tetraacetate

^۴ Rhamnitol pentaacetate

^۵ Fucitol pentaacetate

^۶ Ribitol pentaacetate

آرابینیتول پنتا استات^۱ (پیک ۲۳/۵۲۰)، زایلیتول پنتا استات^۲ (پیک ۲۷/۰۳۵)، ۲-دئوکسی گلوکیتول هگزا استات^۳ (پیک ۲۸/۲۶۵)، آللیتول هگزا استات^۴ (پیک ۳۰/۴۹۳)، مانیتول هگزا استات^۵ (پیک ۳۱/۸۸۷)، گالاکتیکول هگزا استات^۶ (پیک ۳۳/۲۱۸)، گلوستیکول هگزا استات^۷ (پیک ۳۴/۸۲۸)، میو-اینوزیتول هگزا استات^۸ (پیک ۳۶/۹۲۳) (Wrolstad, 2012).

۱-۵-۳- تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی

اندازه حلقه و موقعیت اتصال گلیکوزیدی واحدهای قندی در پلی ساکاریدها با آنالیز متیلاسیون تعیین می شوند. تعیین پیکربندی آنومری از طریق اکسایش با تری اکسید کرومیوم مرسوم است و از این روش می توان در کنار روش های نوین نظیر بمباران اتمی سریع^۹ طیف سنجی جرمی برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد ساختار استفاده کرد. ثابت شده است که طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای دوبعدی^{۱۰} روش انتخابی برای این منظور است (Cui, 2005). در ادامه به شرح مهم ترین روش ها مانند متیله کردن، روش های اکسایش و هیدرولیز اسیدی ناقص (ملایم) پرداخته می شود.

۱-۵-۳-۱- متیله کردن

آنالیز متیلاسیون جهت تعیین ساختار کربوهیدرات ها بالغ بر یک قرن است که استفاده شده و هنوز هم از قدرتمندترین روش ها در آنالیز ساختار کربوهیدرات هاست. آنالیز متیلاسیون شامل دو مرحله است:

- مشتقات شیمیایی
- طیف سنجی جرمی-کروماتوگرافی مایع-گازی (Cui, 2005).

^۱ Arabinitol pentaacetate

^۲ Xylitol pentaacetate

^۳ 2-Deoxyglucitol hexaacetate

^۴ Allitol hexaacetate

^۵ Mannitol hexaacetate

^۶ Galactitol hexaacetate

^۷ Glucitol hexaacetate

^۸ Myo-inositol hexaacetate

^۹ Fast atom bombardment (FAB)

^{۱۰} Two dimensional (2D) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

بیشتر تکنیک‌های پیشرفته‌تر اغلب برای تعیین مشخصاتی مثل آنالیز متیلاسیون همراه با طیف‌سنجی جرمی- کروماتوگرافی گازی و مایع مورد نیاز است. متیلاسیون بر اساس تبدیل تمام گروه‌های هیدروکسیل آزاد مستقر در پلی‌ساکارید به اتر متیل توسط واکنش با متیل یدید در محلول قلیایی است. قندهای ساده آزاد توسط هیدرولیز اسیدی رها شده، احیا و استیله می‌شوند و به صورت استات‌های آلدیتول پاره‌ای متیله شده، توسط GLC اغلب در ترکیب با طیف‌سنجی جرمی آنالیز می‌شوند (Andersson, Westerlund and Aman, 2006).

زمانی که آنزیم مناسبی جهت تجزیه پلی‌ساکارید دیواره سلولی در دسترس نباشد و یا زمانی که اطلاعات ساختاری درباره پلی‌ساکارید جدید نیازمند باشیم آنالیز متیلاسیون مفید است. قندهای پاره‌ای متیله شده باید به مشتقات فرار تبدیل شوند که معمولاً این فرآیند شامل احیا مونوساکاریدها به آلدیتول‌های مربوطه توسط NaBH_4 (یا NaB_2H_4 که اتمام احیای اصلی می‌تواند در طول طیف‌سنجی جرمی صورت بگیرد)، سپس استیله شدن آن‌ها با انیدرید استیک است (Ulvskov, 2010).

۱-۵-۳-۲- هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)

آنالیز ترکیبی از پلیمرهای کربوهیدراتی از طریق این روش، شامل هیدرولیز ملایم قند توسط اسیدهای ضعیف و به دنبال آن کروماتوگرافی گازی و مایع یا کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا محصولات حاصل از هیدرولیز است (Andersson, Westerlund and Aman 2006). هیدرولیز اسیدی ملایم روشی بسیار سودمند در تعیین ساختار پلی‌ساکاریدها است. پلی‌ساکاریدها با استفاده از هیدرولیز اسیدی ملایم (برای مثال توسط اسیدسولفوریک $0.5-1.0\%$ نرمال در دمای 100°C) به‌طور تصادفی به مخلوطی از مونو و الیگوساکاریدها تبدیل می‌شوند. همچنین امکان شکستن نوع خاصی از اتصالات آن‌ها به مخلوط‌های همسان به‌صورت ترجیحی با استفاده از این روش وجود دارد. به‌علت تفاوت در پایداری اتصالات گلیکوزیدی مونوساکاریدهای مختلف، می‌توان اطلاعات مفیدی درباره توالی گلیکوزها و اتصالات آن‌ها با توجه به شناسایی مونو و الیگو ساکاریدهای حاصل از هیدرولیز اسیدی ملایم بدست آورد. مونوساکاریدها با حلقه‌های فورانوز در مقابل اسید بسیار ناپایدار بوده و به آسانی تحت شرایط هیدرولیز

اسیدی ملایم شکسته می‌شوند. در مورد هگزوپیرانوزها، اتصالات نوع ۱ به ۶ نسبت به سایر اتصالات (۱) به ۲، ۱ به ۳ و ۱ به ۴)، پایدارتر بوده و اتصالات نوع بتا نیز نسبت به اتصالات نوع آلفای مشابه پایدارتر است. اتصالات اسیدهای اورونیک به مونوساکاریدهای خنثی از سایر اتصالات موجود در ساختار پلی‌ساکاریدها مقاوم‌تر است (Heinz, 2005; Cui, 2005).

۱-۵-۱-۳-۳-اکسایش

پلی‌ساکاریدها حاوی گروه‌های هیدروکسیل آزاد از پتانسیل واکنش با ترکیبات اکسیداسیون برخوردارند بنابراین واکنش‌های اکسیداسیون می‌تواند جهت روشن ساختن اطلاعات ساختاری پلی‌ساکاریدها مورد استفاده قرار گیرد. اطلاعاتی در مورد نوع اتصالات، الگوی استخلاف تعیین توالی و آرایش آنومری اتصالات (آلفا و بتا) در پلی‌ساکاریدها از این دسته اطلاعات هستند (Cui, 2005).

بسیاری از مشتقات پلی‌ساکاریدی صنعتی با فرآیند اکسایش تولید می‌شوند. بسیاری از عوامل اکسید کننده در واکنش خود غیر انتخابی عمل می‌کنند و گروه‌های کربونیل و کربوکسیل را بسته به شرایط با نسبت‌های مختلفی تولید می‌کنند. متداول‌ترین روش اکسایش (تحت شرایط مطلوب) به صورت کمی انجام می‌شود، از اسید پریودیک^۱ به عنوان ماده اکسید کننده استفاده می‌کنند. اکسایش شدید پریودات عمدتاً پایداری هیدرولیتیک مشتقات متناظر را کاهش می‌دهد و اصلاح مونومرهای کربوهیدرات‌های حلقوی به غیر حلقوی منجر به ایجاد اختلال در ساختار زنجیر پلیمری می‌شود. اکسید کننده‌های بسیاری از جمله هیپوبرمیک^۲ و اسید هیپوکلریک^۳، سدیم هیپوکلریت^۴، سدیم هیدروکلرید^۵، برم^۶ و کلر^۷ نیز اغلب استفاده می‌شود. تمام واکنشگرهای ذکر شده منجر به الحاق گروه‌های عاملی و کربوکسیل به پلی‌ساکارید می‌شود که بسته به pH و شرایط دمایی محیط واکنش نسبت‌های مختلفی خواهد داشت.

^۱ Periodic acid

^۲ Hypobromic

^۳ Hypochloric

^۴ Sodium hypochlorite

^۵ Sodium hydrochlorite

^۶ Bromine

^۷ Chlorine

همه فرایندهای اکسایش نامبرده کمابیش با واکنش‌های جانبی پلی‌مرزدایی^۱ شدید همراه است. اکسایش با نمک‌های سریوم^۲ در سلولز و دکستران انجام می‌گیرد و هر دو محصول کربوکسیلات و دی‌آلدهید را با انجام واکنش در دماهای مختلف می‌توان بدست آورد. ازن^۳ نیز می‌تواند پلی‌ساکاریدهایی نظیر سلولز و نشاسته را به منظور دستیابی به گروه‌های کربونیل و کربوکسیل با درجه‌ای مشخص اکسید کند. (Lapasin and Pricl, 1995).

۱-۵-۱-۳-۱- اکسایش پریودات و تجزیه اسمیت

اکسایش پریودات و تجزیه اسمیت روشی بسیار کارآمد برای تعیین ساختار، توالی و نوع اتصالات در پلی‌ساکاریدهاست. پریودات سبب شکستن اتصالات در کربن‌های حاوی گروه‌های هیدروکسیل مجاور هم می‌شود. اسید پریودیک و نمک‌های آن در محلول‌های آبی با pH ۳ تا ۵ مسئول انجام این واکنش‌ها هستند (Chaplin and Kennedy, 1994; Muralikrishna and Sabba Rao, 2007).

۱-۵-۱-۳-۲- اکسیداسیون با تری‌اکسید کروم

تمام آلدوپیرانوزیدهای استیله شده در موقعیت بتا آنومری به راحتی می‌توانند توسط تری‌اکسید کروم در اسید استیک، اکسید شوند در حالی که وجود یک آگلیکون^۴ متصل به موقعیت آلفا به کندی اکسید می‌شود. این واکنش می‌تواند برای تشخیص موقعیت آنومری باقی‌مانده قندی در الیگوساکاریدها مورد استفاده قرار گیرد. اگر استیله شدن پلی‌ساکارید کامل نباشد برخی مشکلات از جمله اکسید شدن باقی‌مانده‌های حاوی گروه‌های هیدروکسیل آزاد با تری‌اکسید کروم بدون در نظر گرفتن موقعیت آنومری اتفاق می‌افتد. موقعیت آنومری معمولاً توسط اکسیداسیون تری‌اکسید کروم تعیین می‌شود و این روش می‌تواند در ترکیب با تکنیک‌های مدرن مثل بمباران سریع اتم^۵- طیف سنجی جرمی، برای یافتن

^۱ Depolymerization

^۲ Cerium salts

^۳ Ozone

^۴ Aglycone

^۵ Fast atom bombardment (FAB)

اطلاعات ساختاری بیشتر از نوع کنفورماسیونی آنومری قندهای پیرانوزی در الیگوساکاریدها بکار گرفته شود (Cui, 2005).

۱-۵-۲- روش‌های آنزیمی

زمانی که روش‌های آنزیمی در ترکیب با روش استخراج شیمیایی سنتی استفاده می‌شود، اطلاعات لازم درباره ساختمان دیواره سلولی افزایش می‌یابد، اگرچه آنزیم‌های خاص مورد نیاز معمولاً در دسترس نیستند. اندوپلی گالاکتوروناز^۱، اندوگلوکاناز^۲، اندوگلوکورونوزیلاناز^۳، نمونه‌هایی از آنزیم‌هایی هستند که برای تخریب خاص سلول‌های دیواره استفاده می‌شوند. گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌ها از اجزای مهم دیگر ماتریکس سلول‌های دیواره هستند. قندهای ساده می‌توانند به وسیله روش‌هایی بر اساس ویژگی خاص ساکارید تعیین شود و استفاده از آنزیم‌ها این ویژگی را فراهم می‌کند. این روش شامل تیمار قند با آنزیم مناسب و سپس تعیین محصولات واکنش توسط روش اسپکتروفتومتری است. گلوکز (بوژه D-B-گلوکز) را می‌توان با گلوکز اکسیداز اکسید کرد تا هیدروژن پراکساید تولید شود که سپس با نوعی رنگ در حضور پراکسیداز وارد واکنش می‌شود و غلظت محصول رنگی متناسبی با غلظت اولیه گلوکز خواهد بود، به عنوان جایگزین گلوکز بوسیله هگزوکیناز به گلوکز ۶ فسفات تبدیل می‌شود و سپس نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئیک فسفات^۴ در حضور گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز و NADP به NADPH احیا می‌شود. غلظت محصول آخر طیف نورسنجی در ۳۴۰ nm تعیین می‌شود.

تعیین لاکتوز بر اساس هیدرولیز آن توسط بتاگالاکتوزیداز به گالاکتوز و گلوکز تبدیل می‌شود. گالاکتوز سپس توسط کاهش NADP در حضور بتا گالاکتوز دهیدروژناز اندازه‌گیری می‌شود. با عمل اینورتاز (بتا فروکتوزیداز) گلوکز و فروکتوز تولید می‌شود و گلوکز می‌تواند به وسیله روش هگزوکیناز اندازه‌گیری شود

(Andersson, Westerlund and Aman, 2006).

^۱ Endopolygalacturonases

^۲ Endoglucanases

^۳ Endoglucuronoxylanase

^۴ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)

۱-۵-۳- روش‌های طیف‌سنجی

طیف‌سنجی روشی برای تحلیل ساختمان مولکول‌ها بر پایه نحوه جذب تابش توسط آن‌هاست. اگرچه انواع متعددی از روش‌های طیف‌سنجی وجود دارد. تکنیک‌هایی که به‌طور متداول در شیمی آلی کاربرد دارند عبارت‌اند از: رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR)، مادون قرمز (IR)، فرابنفش (UV) و طیف‌سنجی جرمی. طیف‌سنجی NMR محیط ساختمانی هسته‌های مجزا، بویژه هیدروژن و کربن را کندوکاو می‌کند. شاید بتوان گفت با ارزش‌ترین اطلاعات درباره ساختمان مولکول از این روش به‌دست می‌آید (میر محمد صادقی و همکاران، ۱۳۹۲).

پلی‌ساکاریدهای سلول‌های دیواره گیاهان، برخلاف پلی‌ساکاریدهای باکتریایی، اغلب فاقد واحدهای تکرار شونده هستند. NMR یک ابزار مهم برای بررسی ساختار پلی‌ساکاریدهاست. تکنیک‌های طیف‌سنجی جرمی در مطالعات قطعات الیگومری پلی‌ساکاریدها با ارزش است و ترکیب بمباران اتمی سریع-طیف‌سنجی جرمی می‌تواند برای تعیین موقعیت پیوند بین مونوساکارید استفاده شود (Andersson, Westerlund and Aman, 2006).

۱-۵-۳-۱- درجه چرخش نوری پلاریمتری

نور را می‌توان به‌صورت تابش الکترومغناطیس در نظر گرفت که از دو بردار نوسان‌کننده میدان الکتریکی و مغناطیسی عمود بر هم و عمود بر امتداد انتشار نور تشکیل شده است. در نور معمولی، میدان در همه جهات امتداد پیدا می‌کند. این حالت با عبور نور معمولی از منشور نیکل که فقط به یکی از امتدادهای بی‌شمار اجازه گذار می‌دهد، تغییر می‌کند. به پرتو حاصل پلاریزه (قطبیده) مسطح گفته می‌شود، که به معنی این است که بردار میدان الکتریکی در یک صفحه قرار دارد.

وقتی نور از مولکولی عبور می‌کند، الکترون‌های اطراف هسته و در پیوندهای مختلف با میدان الکتریکی پرتو نور برهمکنش (تأثیر متقابل) دارند. اگر نور پلاریزه مسطح باشد بردار الکتریکی ممکن است با توجه به ماهیت مولکول تغییر نموده یا تغییر نکند. چرخش نوری با استفاده از دستگاه پلاریمتر اندازه‌گیری

می‌شود. اغلب منبع نور تک‌فام (یا نور تک‌رنگ که فقط یک طول موج دارد) لامپ سدیم D ($\lambda = 5890 \text{ \AA}$) است. نور ابتدا توسط منشور نیکول پلاریزه مسطح می‌شود و متعاقباً از یک محفظه محتوی نمونه عبور می‌کند. میزان چرخش صفحه پلاریزاسیون با چرخاندن منشور نیکول دیگری به نام آنالیزور به اندازه‌ای که حداکثر (ماکزیمم) نور عبور کرده و به چشم مشاهده‌کننده برسد، تعیین می‌شود (میر محمد صادقی و همکاران، ۱۳۹۲).

آنانتیومرها که پیش از این به عنوان مولکول‌های استریو ایزومری نامنطبق معرفی شدند به صورت تصاویر آینه‌ای هستند. این با مدل‌های مولکولی که به وسیله یک مدل بتا-دی گلوکوپیرانوز ساخته شده است، بهتر نشان داده می‌شود و سپس از آن تصویر آینه‌ای خود را که بتا-ال-گلوکوپیرانوز است را تشکیل می‌دهد. دو مولکول می‌توانند به صورت تصویر آینه‌ای با قرار گرفتن آن‌ها به صورت سربه‌سر یا متناوب با قرار گرفتن یکی در زیر دیگری مجسم شوند. این ساختارها به صورت نامنطبق هستند و خاصیت پخش نور پلاریزه مسطح در مقادیر یکسان اما در جهت‌های مخالف را دارند (فعالیت نوری توانایی پخش نور پلاریزه مسطح است). برخی قندهای نوع D (مانند D-گلوکز و D-زایلوز) راست گردان هستند و توانایی چرخاندن نور پلاریزه مسطح به راست یا در جهت حرکت عقربه‌های ساعت را دارند در حالی که دیگر قندهای نوع D (مانند D-آرابینوز، D-ریبوز، D-فروکتوز) چپ گردان هستند و توانایی چرخاندن نور پلاریزه مسطح به چپ یا در خلاف جهت حرکت عقربه‌های ساعت را دارند. بنابراین، D و L بودن یک قند را نمی‌توان پیش‌بینی کرد، خواه یک قند راست گردان یا چپ گردان باشد. طرح D و L نباید با d و l که نشان‌دهنده فعالیت نوری و دلیل راست گردان یا چپ گردان بودن است، اشتباه گرفته شود. نام‌های ساده دکستروز و لولوز برای گلوکز و فروکتوز به ترتیب بنیادشان از D گلوکز که راست گردان و D فروکتوز که چپ گردان است، منشأ می‌گیرد. چرخش ویژه یک خصوصیت فیزیکی در قندهاست که در شناسایی قندها و اندازه‌گیری غلظت آن‌ها مفید است (Wrolstad, 2012).

۱-۵-۳-۲-طیف‌سنج فرابنفش و مرئی

طیف نور خورشید به دو ناحیه مرئی و نامرئی تقسیم می‌شود که ناحیه مرئی نور در محدوده طول موج‌های ۴۰۰-۷۵۰ نانومتری است و ناحیه نامرئی شامل طول موج‌های کمتر از ۴۰۰ نانومتر مانند پرتوهای فرابنفش و گاما است. اشعه فرابنفش به دلیل داشتن طول موج کوتاه انرژی بالایی دارد و به طیف‌های (۳۲۰-۳۹۰) A- (۲۸۰-۳۲۰) B و (۲۵۴-۲۸۰) C نانومتر تقسیم می‌شود (Hollosoy, 2002). طیف‌سنجی UV و مرئی را می‌توان برای شناسایی برانگیختگی‌های الکترونی در مولکول‌های آلی به کار برد. با افزایش تعداد اوربیتال‌های مولکولی حالت‌های انتقال ممکن افزایش می‌یابد و بنابراین باندهای جذبی در طیف نیز افزایش می‌یابند. باند جذبی با بیشترین طول موج معمولاً مربوط به انتقال الکترون اوربیتال پرشده به پایین‌ترین اوربیتال پر نشده است. انرژی با افزایش پیوندهای مزدوج کاهش می‌یابد (میر محمد صادقی و همکاران، ۱۳۹۲). بیشترین کاربرد طیف فرابنفش و مرئی برای پلی‌ساکاریدها مربوط به تایید مراحل خالص‌سازی قبلی و اندازه‌گیری قند کل می‌باشد. عدم جذب در ناحیه ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش نشان‌دهنده عملکرد خوب در مراحل خالص‌سازی و عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی‌ساکارید است (Cui, 2005).

۱-۵-۳-۳-طیف‌سنج مادون قرمز

این روش وسیله بسیار مفیدی برای تعیین ساختار ترکیبات آلی است، زیرا قادر است حضور اغلب گروه‌های عاملی را تشخیص دهد و برانگیختگی ارتعاشی اتم‌های اطراف پیوندهای مربوط به آن‌ها را اندازه‌گیری می‌کند. محل خطوط جذبی بستگی به نوع گروه‌های عاملی دارد و طیف IR برانگیختگی ارتعاشی اتم‌های اطراف پیوندهای مربوط به آن‌ها را اندازه‌گیری می‌کند. محل خطوط جذبی بستگی به نوع گروه‌های عاملی موجود دارد و طیف IR در کل یک الگوی منحصربه‌فرد برای هر ترکیب خاص نمایش می‌دهد. در انرژی‌های پایین‌تر از انرژی تابش مرئی، مولکول‌ها انرژی جذب می‌کنند و از حضور گروه‌های عاملی ویژه می‌توان با استفاده از طیف‌سنج مادون قرمز اطمینان حاصل کرد. مادون قرمز باعث

تحریک ارتعاشی پیوندها در مولکول‌ها می‌شود. پیوندهای قوی و اتم‌های سبک در فرکانس‌های کششی نسبتاً بالا که برحسب عدد موج (عکس طول‌موج) اندازه‌گیری می‌شوند، ارتعاش می‌کنند. برعکس پیوندهای ضعیف و اتم‌های سنگین در اعداد موج پایین‌تری جذب دارند. به علت تنوع در شیوه‌های کششی و خمشی، طیف‌های مادون‌قرمز معمولاً الگوهای پیچیده‌ای نشان می‌دهند. به‌هرحال از این الگوها با استفاده از ناحیه اثرانگشت می‌توان برای تشخیص ترکیبات خاصی استفاده کرد (میر محمد صادقی و همکاران، ۱۳۹۲). از ویژگی‌های متمایز بین IR و رامان^۱ این است که، طیف رامان برای محلول‌های مولکول‌ها به دست آید، زیرا آب طیف رامان ضعیفی دارد که تنها به میزان بسیار اندک برای طیف حل‌شونده مزاحمت ایجاد می‌کند. برعکس آب جذب شدیدی در IR دارد که مانع طیف‌سنجی در محلول‌ها می‌شود. طیف سنجی IR مولکول‌ها را به سطح بالاتر انرژی برانگیخته می‌کند و پیرامون کربوهیدرات‌ها با موفقیت بکار گرفته شده‌اند که در تشخیص ساختار اولیه و آنالیز مستقیم پلی‌ساکاریدها از فرکانس گروه‌های قابل شناسایی کمک گرفته می‌شود. فرکانس کششی برخی از گروه‌های عاملی پلی‌ساکاریدها و بسیاری از مشتقات متداول آن‌ها نظیر OH، EH، EOOH، EONH، EOOR، و NO₂ به آسانی شناسایی می‌شود (Lapasin and Pricl, 1995).

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری^۲ (FTIR) تکنیک طیف‌سنجی متداول دیگری است که معمولاً برای آنالیز دیواره سلولی استفاده می‌شود. این روش بر اساس ارتعاشات یا انتقال انرژی در پیوندهای شیمیایی مختلف عمل می‌کند. FTIR روشی بسیار سریع و غیرتهاجمی است که می‌تواند برآورد کمی از گروه‌های اصلی مختلف در ماکرومولکول‌های متفاوت، شامل استرکربوکسیلیک، آمیدها، پروتئین و اسیدکربوکسیلیک را حاصل کند. همچنین اطلاعاتی درباره ترکیبات کربوهیدرات‌ها را در اختیار قرار می‌دهد. مقایسه طیف‌ها با یکدیگر به منظور به دست آوردن مهم‌ترین اطلاعات، کاری چالش برانگیز است. پیچیدگی و تغییر پذیری طیف‌های متفاوت برای بدست آوردن هرگونه اطلاعات از طریق مقایسه

^۱ Raman

^۲ Fourier Transform Infrared

بصری طیف ها کاری کاملاً دشوار است. روش های آماری مختلفی جهت مقایسه دو طیف یا بیشتر استفاده می شود. طیف مادون قرمز پلی ساکاریدها با استفاده از نمونه های جامد حاصل می شود (۱-۱۰ میلی گرم). جهت آماده سازی نمونه ها می توان از روش تهیه قرص با کمک برومور پتاسیم جامد و یا مخلوط کردن با نوژول^۱ (نوعی روغن پارافینی با جرم مولکولی بالا) استفاده کرد. سپس نمونه های آماده شده را در محفظه یا سلول های دستگاه مادون قرمز قرار داده و اطلاعات حاصل را بصورت پیک دریافت می کنیم. به طور کلی با استفاده از طیف سنج مادون قرمز در طیف ۴۰۰-۴۰۰۰ cm^{-1} دست یافتن به اطلاعاتی نظیر آرایش فضایی آنومری، گروه های عاملی و الگوهای استخلافی در پلی ساکاریدها امکان پذیر خواهد بود (Muralikrishna and Subba Rao, 2007; Ulvskov, 2010).

۱-۵-۳-۴- طیف سنج رزونانس مغناطیسی هسته ای

طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته بر اساس اندازه گیری تابش الکترومغناطیسی در ناحیه فرکانس رادیویی حدود ۴ تا ۶۰۰ مگاهرتز بنا شده است. برخلاف جذب فرابنفش، مرئی و مادون قرمز، هسته اتم ها به جای الکترون های بیرونی در فرآیند جذب درگیرند. به علاوه، برای آنکه هسته حالت های انرژی مورد نیاز جهت جذب را پیدا کند، لازم است نمونه در یک میدان مغناطیسی شدید قرار گیرد. طیف بینی رزونانس مغناطیسی هسته یکی از تواناترین وسایل در دسترس شیمی دان و زیست شناسان برای مشخص کردن ساختار گونه های آلی و معدنی است. این فن برای تعیین کمی گونه های جاذب نیز مفید است. در حال حاضر دو نوع کلی طیف سنج رزونانس مغناطیسی هسته مورد استفاده است: موج پیوسته^۲ (CW) و تپی یا تبدیل فوریه. در هر دو نوع دستگاه، نمونه در یک میدان مغناطیسی قوی که قدرتی برابر چند تسلا دارد قرار می گیرد. یکی از کاربردهای مفید NMR تعیین گروه های عاملی مانند گروه های هیدروکسیل در الکل ها و فنولها، آلدئیدها، اسیدهای کربوکسیلیک، هیدروژنه ای استیلنی و آمین ها بوده است (سلاجقه، ۱۳۸۹).

^۱ Nujol

^۲ Continuous wave

اکثر هسته‌های اتمی را می‌توان طوری تصور کرد که در حال چرخش حول محورشان هستند و از این رو گفته می‌شود دارای اسپین هسته‌ای می‌باشند. یکی از این هسته‌ها هیدروژن است که به صورت (ایزوتوپ هیدروژن با جرم یک) H^1 نوشته می‌شود تا بتوان آن را از سایر ایزوتوپ‌ها (دوتریوم و تریتیوم) تشخیص داد. از آنجاکه پروتون دارای بار مثبت است، حرکت چرخشی اسپینی آن یک میدان مغناطیسی ایجاد می‌کند (همان‌طور که ذره باردار به همین ترتیب عمل می‌کند). نتیجه این اثر این است که پروتون را می‌توان به صورت یک میله مغناطیسی کوچک و ظریف در نظر گرفت که آزادانه در یک محلول یا در فضا شناور است. رزونانس مغناطیس C^{13} برای اولین بار در سال ۱۹۵۷ مورد مطالعه قرار گرفت اما تا اوایل ۱۹۷۰ مورد استفاده گسترده واقع نشد. از نقطه نظر توانایی در شناسایی ساختارهای آلی و زیست‌شیمیایی C^{13} NMR به جای نمای بیرونی اطلاعاتی در مورد ترکیب‌بندی مولکول‌ها در اختیار می‌گذارد. جابجایی شیمیایی برای C^{13} در غالب ترکیبات آلی حدود ۲۰۰ ppm است، در مقایسه با پروتون که تقریباً بین ۱۰ تا ۱۵ ppm است، در نتیجه پیک‌های حاصل همپوشانی کمتری دارند.

محل جذب NMR موسوم به جابجایی شیمیایی به دانسیته الکترونی اطراف هیدروژن بستگی دارد. این دانسیته به نوبه خود توسط محیط ساختمانی هسته تحت بررسی کنترل می‌گردد. بعضی هسته‌ها مانند H^1 و C^{13} را می‌توان به صورت مغناطیس‌های اتمی کوچکی در نظر گرفت که وقتی در معرض میدان مغناطیسی واقع شوند، می‌توانند با آن در یک جهت (α) یا مخالف با آن (β) قرار گیرند. این دو حالت از نظر انرژی نابرابر هستند، حالتی که در طیف‌نگاری رزونانس مغناطیس هسته‌ای مورد بهره‌برداری واقع می‌شود بنابراین جابجایی شیمیایی هیدروژن‌ها در یک مولکول اطلاعات و سرنخ‌های مهمی برای تعیین ساختمان مولکولی می‌دهند (میرمحمد صادقی و همکاران، ۱۳۹۲).

سیگنال‌های H^1 NMR به دلیل فراوانی طبیعی آن‌ها بسیار حساس‌تر از سیگنال‌های C^{13} NMR هستند. هنگامی که محتوی پلی‌ساکارید در نمونه کمتر از ۲۰٪ باشد، بدست آوردن اطلاعات با کیفیت بالا حتی برای اهداف تایید شده نیز بسیار دشوار می‌شود، بنابراین استفاده از تکنولوژی NMR نیازمند جداسازی

و خالص سازی پلی ساکاریدهاست. طیف NMR در جابه جایی های شیمیایی نسبت به یک استاندارد داخلی (تترا متیل سیلان^۱) بیان می شود. سیگنال های اتم های کربن دارای گروه های هیدروکسیل اولیه مانند C₆ در پیرانوزها و C₅ در فورانوزها در محدوده ۶۰-۶۴ ppm ظاهر می شود، در حالیکه اتم های کربن با گروه های هیدروکسیل ثانویه (C₂، C₃، C₄ در پیرانوزها و C₂، C₃ در فورانوزها) در محدوده ۶۵-۶۸ ppm ظاهر می شوند. در تعیین طیف NMR حاصل از یک پلی ساکارید ناشناخته، اولین قدم، مقایسه طیف با مستندات علمی موجود است. شناسایی بیشتر طیف می تواند با استفاده از NMR دو بعدی و تکنیک های دیگر کامل شود. طیف ¹H NMR می تواند برای آنالیز کیفی پلی ساکاریدها استفاده شود. مناطق زیر پیک ها با تعداد پروتون موجود در نمونه متناسب هستند و با استفاده از یک استاندارد داخلی مناسب، نتایج بسیار دقیقی بدست می آیند. با این حال هم پوشانی شدید سیگنال های پروتون، مانع آنالیز کمی پلی ساکاریدها در یک نمونه می شود ولی سیگنال های کربن های آنومر در طیف ¹³C NMR به خوبی از دیگر سیگنال های طیف جدا می شود (Stephen and Phillips, 2006).

^۱ Tetramethylsilane (TMS)

• بزرگ‌ترین سرده در گیاهان گل‌دار

سرده گون (Fabaceae Papilionaceae) با بیش از ۲۰۰۰-۳۰۰۰ گونه در حدود ۲۵۰ بخش شامل گونه‌های علفی یک‌ساله یا چندساله و از جمله گروه مستقل (Astracantha) است. بخش‌های این سرده بر اساس صفات ریخت‌شناسی از جمله طول ساقه، اتصال گوشوارک، شکل، برگ و حالت میوه‌ای مشخص می‌شوند. (Sanderson and Wojciechowski, 1996)

۱-۶-۱- تاریخچه مطالعات سیستماتیکی سرده گون:

اولین نظام طبقه‌بندی دوکندول^۲ در سال ۱۸۲۵ صورت گرفته بود. در این اثر گونه‌های مختلف گون با تعداد محدود در سطح بخش‌ها گروه‌بندی گردیده بودند، با آنکه در معرفی گون‌ها از نام بخش استفاده نشده بود و انحصاراً از علائم اختصاری آن استفاده شده موجبات آن را فراهم آورد که گیاه‌شناسان و متخصصین گون بعد از کار اولیه دوکندول کمتر آن را مورد استفاده قرار دهند، با وجود اینکه گون‌ها در سطح بخش‌ها طبقه‌بندی شده بودند، به علت تنوع گونه‌های زیاد سرده گون از ارائه‌ی شرح تاکسونومیک توسط لینه در سال ۱۷۵۴ میلادی تاکنون دستخوش تغییرات و جابجایی عمیقی گردیده است (معصومی ع. ا. ۱۳۷۹).

تا سال ۱۸۵۲ با جمع‌آوری‌های خوب که از نقاط مختلف ایران توسط اولیویر^۳، اوشر الو^۴، زویتس^۵، کچی^۶، بنیرت^۷ و بونگه^۸ انجام گرفت، زمینه را برای تحقیقات دامنه‌دار رده‌بندی گون‌ها در شوروی و سوئیس فراهم کرد. برای اولین بار بونگه در سال ۱۸۶۸ شالوده طبقه‌بندی گون را بنا نهاد و

^۱ Astragalus L

^۲ De Candolle

^۳ Olivier

^۴ Ashar Alo

^۵ Sewitz

^۶ Kachi

^۷ Banrit

^۸ Bunge

سرده گون را به ۹ زیر سرده انجام و حدود ۱۵۰ بخش تقسیم‌بندی کرد و در سال ۱۸۶۹ نسبت به شرح گونه‌های جدید فراوان و پراکندگی آن‌ها اقدام نمود. انتشار این اثر جاویدان که بر پایه جمع‌آوری‌های مشخص خود بونگه و همراهش بود، تعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده سال‌های قبل را نیز در بر می‌گرفت و سبب شد که تیپ کلیه گونه‌های جدید شرح داده‌شده در هرباریوم سن‌پترزبورگ (لنینگراد) و تعدادی از نمونه‌های مازاد در هرباریوم های پاریس و گیاهان شرق نگهداری شود. ادموند بوآسیه^۱ در سال‌های ۱۸۴۳ تا ۱۸۷۲ نسبت به چاپ و انتشار مقالاتی اقدام کرد که در این انتشارات او هم گونه‌های جدید فراوانی را معرفی کرده بود. از سال‌های ۱۸۹۰ تا ۱۹۳۰ برنمولر^۲ با مسافرت‌های خود به ایران از نقاط مختلف کشور به‌ویژه از قله کوه‌های مرتفع جمع‌آوری فراوانی داشت و تا سال ۱۹۴۱ نسبت به انتشار تعدادی از گونه‌های جدید گون اقدام کرد. کلیه نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در هرباریوم برلین نگهداری می‌شوند که متأسفانه بخشی از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در جنگ جهانی دوم در برلین از بین رفت.

در سال ۱۹۴۶ بارنبی^۳ اطلس گون‌های آمریکای شمالی را که متجاوز بر ۵۰۰ گونه بود در دو جلد به رشته تحریر درآورد. در این اثر جاویدان مؤلف اصول دیگری غیر از اصول بونگه در رده‌بندی گون‌ها بنیاد نهاد. اصول بکار گرفته‌شده برای رده‌بندی گون‌ها با کلیه دیدگاه‌های موجود در تحقیقات گون‌ها حتی با دیدگاه‌های رده‌بندی دنیای قدیم به‌شدت فاصله دارد و هرچند مطالعات فیلوژنی اخیر که بر روی جنس گون در دنیای جدید صورت گرفته است همه اصول رده‌بندی نامبرده را تأیید نمی‌کند اما با افتخار باید اذعان کرد که در میان طبقه‌بندی‌های متداول جنس گون، طبقه‌بندی بارنبی تا حدود زیادی به طبقه‌بندی فیلوژنی نزدیک‌تر است. از سال‌های ۱۹۶۸ به‌طور پراکنده و اما از سال‌های ۱۹۷۰ پودلش^۴ به‌طور منسجم کار خود را بر روی رده‌بندی جنس گون در دنیای قدیم شروع کرد. او با معرفی

^۱ Edmond Boissier

^۲ Bornmoller

^۳ BARNABY

^۴ Podlesh

متجاوز بر ۳۵۰ گونه جدید گون بی‌تردید بزرگ‌ترین خدمت را به تحقیقات گون شناسی نموده است، گزیده کارهای انجام‌شده امروزه دست‌مایه فلورا ایرانیکا^۱ است (معصومی، ۱۳۸۵).

۱-۶-۲- پراکندگی

اهمیت پراکندگی گون‌ها در دنیای قدیم (به‌غیر از آمریکا و کانادا) و کشور ایران و همچنین شناخت عوامل مهم حاکم بر انتشار آن‌ها می‌تواند کاربردهای عدیده‌ای از نظر مطالعات جغرافیایی، جامعه‌شناسی، اکولوژی و ... به همراه داشته باشد (معصومی، ۱۳۸۵).

۱-۶-۳- بوم‌شناسی و پراکنش سرده گون

جنس گون در میان گیاهان گل‌دار از بزرگ‌ترین جنس‌هاست که در جهان متجاوز بر ۳۳۰۰ گونه را در خود جای می‌دهد. پیرامون تنوع گونه‌ای در این جنس مقالات و چک‌لیست‌های متعددی چاپ‌شده است. نظر به فراوانی زیاد گونه‌ها، در هر یک از منابع اشاره‌شده، نسبت به یکدیگر تناقضاتی را نشان می‌دهند، چراکه به نظر می‌آید بررسی دقیق و همه‌جانبه این جنس در قسمت‌های مختلف جهان هنوز نیاز به تحقیق و بررسی‌های دقیق و عمیق‌تر دارد (معصومی، ۱۳۸۵). پراکنش اصلی گون به نواحی اقلیمی سرد در نیمکره شمالی و آمریکای جنوبی محدود می‌شود. بیش‌ترین تعداد گونه‌های گون به‌طور خاص در نواحی اقلیمی خشک و نیمه سرد (ناحیه ایرانو - تورانی) جنوب غرب و مرکز آسیا (با تقریباً ۱۰۰۰-۱۵۰۰ گونه)، ناحیه سینو- هیمالیا (۵۰۰ گونه)، غرب آمریکای شمالی (۴۰۰-۴۵۰ گونه) و کوه‌های آند در آمریکای جنوبی (۱۰۰ گونه) یافت می‌شوند. همچنین گون در نواحی دارای آب و هوای مدیترانه‌ای سواحل آمریکای شمالی و جنوبی، جنوب اروپا و شمال آفریقا از تنوع گوناگون زیادی برخوردار است. تعدادی از گون‌ها محدوده اندمیکی کوچکی دارند، و اغلب در زیستگاه‌های کناره‌ای یا نواحی خاص (از نظر نوع خاک) یافت می‌شوند (Sanderson and Wojciechowski, 1996; Osaloo et al., 2003). بر اساس چک لیست‌های منتشرشده در قاره استرالیا هیچ‌گونه گون رویش ندارد و نیز

^۱ Flora Iranica

بر اساس چک لیست‌های لگوم‌های آفریقا (Lock, 1989) و چک‌لیست گونه‌های دنیای قدیم (Maassoumi, 1998) حدود ۱۳۸ گونه گون در آفریقا و حدود ۱۴۲ گونه در اروپا پراکنش دارند، البته این نکته را نباید از نظر دور داشت که تعدادی از گونه‌های اروپایی و آفریقایی نیز در آسیا حضور دارند، یک محاسبه ساده نشان می‌دهد که حدود ۲۴۲۰ گونه گون انحصاراً در قاره آسیا پراکنش دارند، برای سهولت کار بهتر است قاره آسیا را از نظر توان گونه‌زایی و غنی گونه‌ای که متأثر از فاکتورهای اکولوژیک زیادی است به اجزا ریزتر تقسیم کرد (Maassoumi, 1998; Lock and Simpson, 1991) که عبارت‌اند از:

- ۱- غرب آسیا: شامل کشورهای ایران، افغانستان، عراق، عربستان، کویت، یمن
- ۲- شوروی سابق: شامل کلیه کشورهای استقلال یافته مانند قفقاز، آذربایجان، گرجستان، اکرین، قزاقستان، تاجیکستان، ازبکستان، ترکمنستان، لیتوانی، لیستونی
- ۳- خاورمیانه: شامل کشورهای ترکیه، سوریه، لبنان، اردن، فلسطین
- ۴- جنوب آسیا: شامل کشورهای هند و پاکستان
- ۵- شرق آسیا: شامل کشورهای چین، نپال و تبت
- ۶- خاور دور: شامل کشورهای تایوان کره، ویتنام و ...
- ۷- منطقه قفقاز: شامل کشورهای آذربایجان، ارمنستان، ماورای قفقاز
- ۸- آسیای میانه: شامل کشورهای ترکمنستان، قرقیزستان، تاجیکستان، ازبکستان و قزاقستان
- ۹- آسیای مرکزی: شامل کشورهای مغولستان و سیبری

در شرق آسیا، کشورهای نپال و تبت حدود ۲۸۰ گونه گون را در خود جای می‌دهد و جنوب آسیا مشتمل بر هند و پاکستان حدود ۱۸۰ گونه گون دارد. بنابراین از مجموع گونه‌های آسیا ۱۹۶۰ گونه انحصاراً در غرب آسیا به‌طور گسترده پراکنش دارند. در کشورهای خاورمیانه و غرب آسیا که مشتمل بر سوریه، لبنان، اردن، فلسطین، عربستان، کویت و یمن هستند. حدود ۱۰ گونه گون را در خود جای می‌دهند، بنابراین ۱۸۰۰ گونه گون در کشورهای ایران، شوروی سابق، ترکیه، افغانستان و عراق به‌طور

گسترده پراکنش دارند. لازم به ذکر است که گونه‌های متعلق به هر کشور انحصاراً در همان کشور پراکنش ندارند. بنابراین کشور ایران با حدود ۲۷۷ گونه مشترک، عراق با ۱۳۶ گونه مشترک، افغانستان با ۱۴۹ گونه، شوروی با ۴۰۰ گونه و ترکیه با ۲۳۶ گونه مشترک هر یک از درصد بالایی از گونه‌های آندمیک برخوردارند.

در کشور ایران، بر اساس آخرین محاسبات به‌عمل‌آمده از بانک اطلاعات، ۸۰۴ گونه جود دارد که از آن میان ۵۰۴ گونه انحصاری و ۲۷۷ گونه مشترک با کشورهای دیگر می‌باشند (معصومی، ۱۳۸۵). این گونه‌ها در ۶۲ بخش قرار می‌گیرند که از این میان ۵ بخش آندمیک ایران هستند (Ghahremani, 2004a; 2005).

محاسبات رقومی گونه‌های گون در استان‌های مختلف کشور پیچیده‌تر از محاسبات گون‌ها در مناطق فیتوژئوگرافی و مناطق فلورستیک کشور است. بر اساس شمارش دقیق بانک اطلاعاتی، ۲۷۷ گونه مشترک به‌دفعات در استان‌های مختلف کشور حضور دارند، بنابراین یک محاسبه ساده نشان می‌دهد که هرگونه در ۵/۴ استان‌های مختلف پراکنش دارند.

در خلال اجرای طرح، یافته‌های علمی فراوان و نتایج زیادی حاصل شده است. گون‌های ایران نه‌تنها انحصاراً در زمینه طبقه‌بندی بلکه با امکانات موجود در عرصه تحقیقات فیلوژنی، بیوسیستماتیک، تنوع، اکولوژی، پراکندگی، گونه‌زایی، بوم‌شناسی و همچنین در زمینه خواص و کاربرد آن‌ها دستاوردهای فراوانی به همراه داشته است (معصومی، ۱۳۸۵).

۱-۶-۴- رده‌بندی و فیلوژنی

همان‌گونه که در ابتدا آمده است، دستاوردهای تاکسونومیک فراوانی چه در سطح بخش‌ها و گونه‌ها و چه در سطح گونه‌های مترادف و همنام به‌دست‌آمده است. اولین نظام رده‌بندی گونه‌ها توسط دوکاندول در سال ۱۸۲۵ پایه‌ریزی شده بود. در آن زمان واحدهای فوق گونه‌ای با نام بخش توسط وی معرفی گردید. در سال‌های ۱۸۴۳ تا ۱۸۵۴ بواسطه ضمن کاربرد اسامی بخش‌های قدیمی، تعدادی دیگر از

بخش‌های جدید را معرفی و استفاده کرد. بونگه در سال ۱۸۶۸ و ۱۸۶۹ بهنگام تدوین نخستین مونوگراف خود در زمینه گون‌ها متأسفانه به کارهای دوکاندول و بواسیه توجه نداشت. پس از بونگه فقط گنچاروف^۱ بود که گون‌های شوروی را با درک صحیح در نظام بونگه بررسی مجدد کرد. در سال ۱۹۴۳ که گنچاروف سرگرم کار طبقه‌بندی گون‌های شوروی بود به تعدادی از اسامی و نام‌های منتشرشده دوکاندول توجه نداشت. از آن‌پس فلور کلیه کشورهای شرق از جمله شوروی، ایران، ترکیه، افغانستان، عراق، پاکستان، لبنان، سوریه، فلسطین و ... با نظام طبقه‌بندی بونگه به رشته تحریر درآمدند. از آنجایی که این جنس بسیار بزرگ و تعداد گونه‌های آن متعدد است و شناسایی آن‌ها دشواری زیادی دارد، برای سهولت رده‌بندی آن‌ها را در هشت زیر سرده (Subgenus) و حدود ۸۵ بخش (Section) قرار می‌دهند که از این میان Subgenus Cercidothrix کرک‌های دوشاخه را دارد که دارای ۱۳ بخش است و همگی از نوع علوفه‌ای هستند.

۱-۴-۶-۱- زیر سرده Cercidothrix

بخش‌های کرک دوشاخه گون متعلق به زیر سرده Cercidothrix (فرم رویشی چندساله) هستند. مرکز تنوع این زیر سرده ناحیه آسیای مرکزی است (Ghahremaninejad, 2004a). آسیای مرکزی با بیش از ۴۰ بخش از مراکز اصلی تنوع گون کرک دوشاخه است که تقریباً ۴۰ گونه آن‌ها اندمیک این ناحیه هستند. این ناحیه دارای ۳۱۰ گونه گون کرک دوشاخه است که ۲۰۱ گونه اندمیک (۲۵٪) گونه‌های کرک دوشاخه‌ای هستند.

این زیر سرده در دنیای قدیم بالغ بر ۸۰۰ گونه دارد که ۱۵۸ (۲۰٪) گونه آن‌ها در ایران وجود دارد و از میان آن‌ها ۸۹ (۵۶٪) گونه اندمیک هستند. اصلی‌ترین مراکز اندمیسم گونه لین زیر سرده ترکیه، ایران، قزاقستان، افغانستان و چین به ترتیب ۹۲، ۸۹، ۴۷، ۳۳ گونه اندمیک هستند (Ghahremaninejad, 2005).

^۱ Goncharov

• اهمیت صفات کرک در زیر سرده *Cercidothrix*

در میان صفات ریخت‌شناسی مورد استفاده در فیلوژنی و طبقه‌بندی درون سرده گون، صفات ریز ریخت‌شناسی زیادی مورد توجه قرار گرفته است. عموماً مهم‌ترین صفات برای جدایی، بخش‌ها درشت ریخت‌شناسی هستند. صفات کرک ممکن است مقیاس خوبی برای تفکیک بخش‌ها از یکدیگر باشند، اما نسبت طول باندهای کرک، نوع کرک (خوابیده یا مجعد) و طول کرک معمولاً در سطح بخش ثابت و پایدار هستند.

بهترین نوع کرک برای مقایسه بخش‌ها کرک‌های میوه و کاسه است. به عنوان مثال بخش‌های *Xiphidium* و *Erioceras* که از لحاظ ریخت‌شناسی متفاوت هستند، کرک‌های میوه و کاسه غیر متشابهی دارند. در حالی که کرک‌های برگچه در آن‌ها بسیار مشابه است (Ghahremaninejad, 2004a). مطالعات انجام گرفته بر روی بخش *Inceni* نشان داد صفات ریز ریخت‌شناسی کرک به علت تنوع خیلی کم در میان گونه‌های این بخش، صفتی با ارزش در گروه‌بندی درون بخش محسوب نمی‌شود. همچنین قهرمانی نژاد در سال ۲۰۰۴ با مطالعه بر روی گون‌های کرک دوشاخه نشان داد که تنوع کرک در داخل این بخش خیلی زیاد نیست و نسبت طول باندهای کرک در برگچه، کاسه، میوه بسیار شبیه هم هستند. اما صفاتی از جمله میزان تقارن کرک که صفتی با ارزش در گروه‌بندی برخی بخش‌ها در زیر سرده *Cercidothrix* است، در میان گونه‌های مختلف این بخش تنوع زیادی را نشان می‌دهد و لذا برای گروه‌بندی درون بخش استفاده نمی‌شود. به هر حال برخی صفات کرک از جمله نیمه خوابیده تا ایستاده بودن، بدون کرک بودن یا داشتن کرک‌های بسیار پراکنده در اندام‌های هوایی می‌تواند برای مشخص کردن گروه‌های طبیعی دارای تعداد کمی گونه استفاده شود (Ghahremaninejad, 2004b).

۱-۶-۲- بخش *Inceni* DC

بخش اینکانی به عنوان یکی از مهم‌ترین و پرگونه‌ترین بخش‌ها در میان گون‌های کرک دوشاخه دارای ۱۳۵ گونه در دنیاست. ایران با ۷۳ گونه (۵۷ گونه اندمیک) ترکیه با ۲۷ گونه، ارمنستان با ۱۹ گونه

آذربایجان با ۱۶ گونه و عراق با ۷ گونه از مهم‌ترین مراکز تنوع این بخش در دنیا به شمار می‌روند. مرکز تنوع این بخش ناحیه ارمنستان ایران از قلمرو ایرانو تورانی است. گونه‌های این بخش معمولاً در آسیای مرکزی خاورمیانه، جنوب، شرق و غرب آسیا، قفقاز، شمال اروپا و آسیا پراکنش دارند. در اغلب فلورهای مربوط به غرب آسیا گونه‌های این بخش به‌عنوان بخش *Proselius Bunge* شناخته می‌شوند. نامی غیرمعمول و نادرست که توسط بونگه در سال ۱۸۶۸ استفاده شد. اما بعد اسمی قدیمی‌تر اینکائی توسط دکاندول در سال ۱۸۲۵ به‌کاربرده شده بود برگردانده شد.

۱-۶-۴-۲-۱- پراکنش بخش Incani DC در ایران

این بخش با ۷۳ گونه شامل ۵۷ گونه اندمیک بزرگ‌ترین بخش گون‌های کرک دوشاخه در ایران محسوب می‌شود. بخش اینکائی پراکنش وسیعی در ایران داشته و بخش بزرگی از ایران در ارتفاعات البرز و زاگرس در شمال و غرب را اشغال می‌کند. به‌طور کلی ایران پلی بین آسیای مرکزی و قفقاز و آناتولی برای مهاجرت این بخش محسوب می‌شود. معمولاً گونه‌های این بخش در ایران در ارتفاعات ۹۵۰ تا ۳۰۰۰ متر رشد می‌کنند (Ghahremaninejad, 2004a).

۱-۶-۴-۲-۲- خویشاوندی‌ها در بخش‌های Incani

نزدیک‌ترین خویشاوندهای این بخش، بخش‌های *Xiphidium* و *Trachycercis Bunge* هستند. این بخش در داشتن دو برگک با دو بخش مذکور تفاوت دارد. معمولاً بخش *Incani* و *Xiphidium* به‌صورت کمپلکس هستند.

Xiphidium بعد از *Incani* به‌عنوان بزرگ‌ترین بخش گون کرک دوشاخه در ایران محسوب می‌شود که در نواحی خشک پراکنش دارد (Ghahremaninejad, 2004a; 2005).

۱-۶-۴-۲-۳- ضرورت و اهداف انتخاب بخش Incani

در میان بخش‌های مختلف *Incani* با داشتن حدود ۱۳۰ گونه از طریق صفات پیشرفته مشترک مشخص می‌شود. این صفات عبارت‌اند از:

۱- فرم رویشی خشکی پسند.

۲- میان گره‌های تحلیل رفته

۳- کرک‌های دوشاخه

۴- آویز جنینی دولایه

۵- جنین تک برگچه‌ای

۱-۶-۵- خواص و کاربرد

گونه‌ها گیاهانی هستند که ضمن تولید کثیرا آن‌ها را در شمار گیاهان صنعتی و دارویی قرار می‌دهد، به خاطر جذب فلزات سنگین و سنتز مواد آلی سمی نیز جز گیاهان سمی به حساب می‌آیند. به‌طور کلی گونه‌ها را از نظر گونه‌های سمی و گونه‌های علوفه‌ای به سه گروه بزرگ تقسیم می‌شوند.

۱- گونه‌هایی با جذب سلنیوم و تراکم آن در بافت خود به‌شدت خاصیت سمی پیدا می‌کنند. این گیاهان در مناطق مختلف جهان پراکنش دارند و میزان جذب و ذخیره سلنیوم متفاوتی را نشان می‌دهند. در صورتی که تراکم سلنیوم بالا باشد آن گونه‌ها برای دام سمی است.

۲- گونه‌ایی که با جذب مواد مختلف در فرایند فتوسنتز، ترکیبات گلیکوزیدهای ازت دار سمی تولید می‌کنند. تعلیف دام و چهارپایان از گونه‌ای ازت دار سمی موجبات تلف شدن آن‌ها خواهد شد.

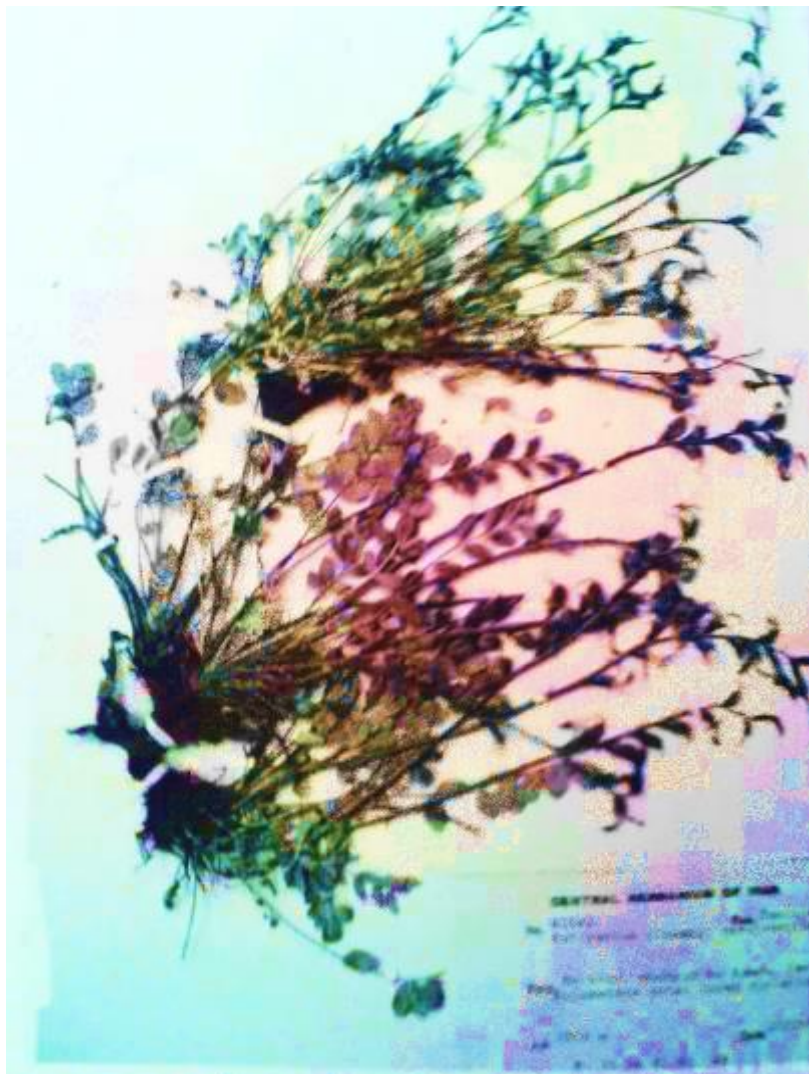
۳- تعدادی از گونه‌های گون که برخلاف دو گروه بالا نه توانایی قدرت جذب سلنیوم دارند و نه ترکیبات ازت دار سمی تولید می‌کنند. این گونه‌ها با میزان پروتئین بالا و کمبود فیبر، به‌شدت مورد چرای دام قرار می‌گیرند و در شمار گیاهان علوفه‌ای قرار دارند. در این زمینه مطالعات اندکی صورت گرفته است. از لحاظ نیاز برای شناخت بیشتر این گونه‌ها، طرح اتواکولوژی پیرامون چندگونه به مرحله اجرا درآمده است، لیکن در مورد میزان پروتئین، فیبر، قابلیت هضم و دیگر مشخصات این گیاهان کار علمی جدی صورت نگرفته است (معصومی، ۱۳۸۵).

۱-۶-۶-گون نوک خمیده^۱

گیاهی به ارتفاع ۵ تا ۴۰ سانتی متر، بدون ساقه کپه‌ای، متراکم غالباً پوشیده از کرک‌های دوشاخه‌ای متقارن و خوابیده، به طول ۰/۴ تا ۰/۷ میلی متر با انشعابات کوتاه ضخیم به قطر ۱۵ میلی متر، به طور متراکم پوشیده از بقایای گوشوارک‌ها و دمبرگ‌های قدیمی (شکل ۱-۴). گوشوارک‌ها سفید به طول ۳ تا ۶ میلی متر، در قاعده اندکی چسبیده به دمبرگ، بخش آزاد مثلثی باریک، به طور متراکم پوشیده از کرک‌های سفید. برگ‌ها به طول ۲ تا ۱۱ سانتی متر، دمبرگ ۱ تا ۵ سانتی متر، به طور متراکم کرک‌دار، برگچه‌ها ۳ تا ۱۱ جفت، بیضوی یا واژه تخم‌مرغی، به طول ۳ تا ۱۰. به عرض ۱/۵ تا ۷ میلی تر، نوک کند تا نوک‌تیز، اندکی نیشک‌دار، هر دو سطح به طور پراکنده یا تنک پوشیده از کرک‌های خوابیده. دمگل‌آذین به طول ۲ تا ۱۲ سانتی متر، شیاردار، به طور پراکنده پوشیده از کرک‌های سفید و خوابیده، گاهی در قسمت فوقانی در مجاورت گل‌آذین مخلوط با کرک‌های سیاه و پراکنده، به تدریج کم کرک یا بی کرک، گل‌آذین خوشه، با ۷ تا ۱۲ گل، بیضوی یا استوانه‌ای، بهنگام میوه بلند و کشیده، به طول ۱۵ سانتی متر. برگه غشائی، متمایل به قهوه‌ای، مثلثی باریک. به طول ۲ تا ۴ میلی متر، بدون کرک. دمگل به طول ۱ میلی متر، غالباً با کرک‌های سفید و سیاه. برگ سفید به طول ۰/۵ میلی متر، در قاعده کاسه. کاسه به طول ۸ تا ۹ میلی متر، لوله‌ای یا استوانه‌ای، در نوک به طور مورب بریده، به طور پراکنده یا متراکم پوشیده از کرک‌های خوابیده سفید و سیاه، دندان‌ها نابرابر، درفشی، به طول ۱ تا ۲/۵ میلی متر. جام زرد یا بنفش. درفش به طول ۱۷ تا ۲۰ میلی متر، پهنک بیضوی یا لوزی، به عرض ۶ تا ۷ میلی متر، نوک کند، گاهی به طرف نوک کشیده و زبانک دار، به طرف قاعده به تدریج باریک شونده، با ناخنک گووه‌ای. بال به طول ۱۴ تا ۱۷ میلی متر، پهنک بیضوی کشیده، در نوک به طور نامتقارن شیاردار، به طول ۷ تا ۸ و به عرض ۱/۵ تا ۲ میلی متر، گوشک‌دار، گوشک به طول ۰/۵ میلی متر، ناخنک به طول ۷ تا ۹ میلی متر، ناو به طول ۱۲ تا ۱۵ میلی متر، پهنک بیضوی مورب، نوک‌تیز به طول ۵ تا ۶ و به عرض ۲/۲ تا ۲/۵ میلی متر، گوشک مثلثی، به طول ۰/۵ میلی متر، ناخنک باریک به طول ۷ تا ۹. تخمدان بدون

^۱ Curvirostris

پایک، تخم‌مرغی، کرک‌دار. میوه‌ای ایستاده، بیضوی مورب یا کروی، بدون پایک، راست به طول ۷ تا ۱۸ میلی‌متر و به ارتفاع ۵ تا ۱۰ میلی‌متر و به عرض ۴ تا ۹ میلی‌متر، بخش شکمی گرد، بارگبندی برجسته، بخش پشتی مسطح، به طرف نوک باریک منقاردار، منقار به طول ۳ تا ۵ میلی‌متر خمیده، والوها قهوه‌ای، منقوط به‌طور پراکنده با نقطه‌های ریز بنفش یا با لکه‌های پراکنده بنفش یا قهوه‌ای، بارگبندی عرضی، کرک‌دار، به‌طور پراکنده پوشیده از کرک‌های دوشاخه‌ای، خوابیده و سفید. دانه‌ها چهار گوشک به طول ۲/۵ تا ۳ میلی‌متر، بنفش تند (معصومی، ۱۳۸۵).



شکل ۱-۴: شکل مربوط به ریشه و اندام‌های هوایی گیاه گون نوک خمیده

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- استخراج و خالص سازی پلی ساکارید

ریشه خشک گون از قدیم‌الایام به‌عنوان عامل ایمنی و سلامت استفاده می‌شده و بالغ بر ۲۰۰۰ سال دارویی گیاهی برای درمان سرماخوردگی، اسهال، خستگی و بی‌اشتهایی بوده است. امروزه ثابت شده که پلی ساکاریدها از عناصر فعال اصلی عهده‌دار فعالیت‌های زیستی هستند. تحقیقات نشان داده است که پلی ساکارید گون اهمیت زیست فعالی مختلفی مانند آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری، ضد دیابت، ضد ویروس، ضد التهاب، ضد تصلب شرایین، تشکیل خون و محافظت نرونی دارد (Li et al., 2012; Niu et al., 2011; Zhu et al., 2011; Li et al., 2009; Liu et al., 2010; Juan et al., 2011; Wu et al., 2005; Jiang et al., 2010; Zhuge et al., 2012; Liu et al., 2003; Li et al., 2007; Li and Zhang., 2009; He et al., 2012; Wang et al., 2010; Cheng et al., 2011; Yang et al., 2010; Zhang et al., 2012; Misaki, 1987).

ثابت شده که ساختار شیمیایی و ترکیب زنجیر پلی ساکارید نقش حیاتی را در فعالیت بیولوژیکی آن‌ها ایفا می‌کند. در حال حاضر اغلب مطالعات انجام شده بر روی اثر درمانی این پلی ساکاریدها جهت افزایش سیستم ایمنی بدن، افزایش انرژی، محافظت کبدی، ادرارآور، ضد دیابت، ضد درد، آرامش‌بخش، درمان عوارض جانبی شیمی درمانی و همچنین حفاظت بدن در مقابل پاتوژن‌ها و عوامل بیماری‌زا، درمان برخی سرطان‌ها، بیماری‌های ویروسی مانند ایدز و افزایش مهار تومورها صورت گرفته است (Jin et al., 2014). از زمانی که تحقیقات پیشین درباره APS توسط وانگ و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش شد با مطالعات انجام گرفته تاکنون ساختار پلی ساکاریدها توسط ترکیبی از تکنیک‌ها مانند، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریدوات، تجزیه اسمیت، کروماتوگرافی ژل تراوا، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی گازی، FTIR، کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی و طیف رزونانس مغناطیس هسته مشخص می‌شود (Wang et al., 1989).

بر اساس مطالعات انجام شد که اکثراً پیرامون اثرات درمانی پلی ساکارید گون ممبراناسه انجام گرفته است، مشخص شده است که اغلب پلی ساکاریدهای حاصل از گون ممبراناسه هتروپلی ساکارید هستند.

با توجه به مواد اولیه مختلف یا فرایندهای متفاوت خالص سازی، نتایج مختلفی در گزارش های گوناگون درباره ترکیب ساختار مشاهده می شود. این هتروپلی ساکاریدها محدوده وزن مولکولی ۸/۷ - ۱۶۹۹/۱ کیلودالتون با نسبت های مختلف از ۹ مونو ساکارید با نام های گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز، رامنوز، مانوز، زایلوز، فوکوز، فروکتوز و ریبوز دارند. ضمناً پلی ساکاریدها ممکن است حاوی اسیدهای گلوکورونیک و گالاکتورونیک باشند. بعلاوه برخی اطلاعات ساختاری و ترکیبی نیز گزارش شده است. تعدادی گلوکان (هموپلی ساکارید) نیز به جز هتروپلی ساکاریدهای ذکر شده جداسازی و خالص سازی شده اند. این گلوکان ها اساساً به صورت آلفا (۱ به ۴) D-گلوکان با وزن مولکولی ۱۲-۳۶ کیلو دالتون تعیین شدند. (Jin et al., 2014).

شی^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر پلی ساکارید گون ممبراناسه بر روی پیشرفت لنفوسیت ها را مورد مطالعه قرار دادند. آن ها پلی ساکارید گون ممبراناسه (AMP^۲) خام را از شرکت داروسازی در استان شادونگ خریداری و سپس در آب مقطر حل کردند. در این بررسی از اتانول برای رسیدن به حجم ۸۰٪ و ترسیب AMP خام استفاده شد و پروتئین ها توسط روش سواگ حذف شدند. در نهایت AMP توسط روش لیوفیلیزه کردن به دست آمد. قند کل توسط روش فنول اسید سولفوریک با استاندارد گلوکز اندازه گیری شد. قندهای ساده توسط روش شرح داده شده ون^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۵ اندازه گیری شدند (Wen et al., 2005). اسید اورونیک توسط روش شرح داده شده توسط مسنگور^۴ در سال ۱۹۸۸ و یو^۵ و همکاران در سال ۲۰۰۹ اندازه گیری شد (Meseguer et al., 1988; Yu et al., 2009). پروتئین با استفاده از روش برادفورد^۶ در سال ۱۹۷۶ با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد

^۱ Shi

^۲ Astragalus membranaceus polysaccharide

^۳ Wen

^۴ Meseguer

^۵ Yu

^۶ Bradford

اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976). قند کل، قند ساده، اسید اورونیک و پروتئین در نتایج AMP $74/63 \pm 1/96$ ، $4/94 \pm 0/13$ ، $15/38 \pm 1/25$ و $4/73 \pm 0/14$ بود (Shi et al., 2015).

در سال ۲۰۱۴ لی^۱ و همکاران به مطالعه بر روی خالص‌سازی پلی ساکارید گون با رزین های منافذ درشت پرداختند. رزین های AB-8، X-5 و D101 مقایسه شدند. محلول APS در غلظت های مختلف برای پیدا کردن نمونه ای با غلظت مناسب در منافذ درشت مورد آزمایش قرار گرفتند و با توجه به نتایج آزمایش مشخص شد که AB-8 بهتر از رزین های دیگر است. ستون کروماتوگرافی با AB-8 رزین برای تخلیص مورد استفاده قرار گرفت و پلی ساکارید با غلظت ۲۰ میلی گرم/ میلی لیتر تا ۹۴/۶۸٪ تخلیص شد (Li et al., 2014).

لیو^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۴ پروتکل آماده سازی پلی ساکارید گون ممبراناسه با روش شرح داده شده توسط لی در سال ۲۰۱۲ را استفاده کردند (Li et al., 2012). پودر خشک ریشه گون ممبراناسه در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور شد (نسبت AM به آب مقطر ۱:۲۰ بود) و استخراج ۳ مرتبه در آب مقطر هربار ۱ ساعت در دمای جوش انجام گرفت. از روش سواگ برای حذف ترکیبات پروتئینی استفاده شد. اتانول ۹۵٪ برای ترسیب به میزان ۳ برابر اضافه شد و سانتریفیوژ $5000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. مقدار پلی ساکارید (۸۷/۴٪) توسط روش فنول اسید سولفوریک تعیین شد و آنالیز مونوساکاریدها توسط HPLC با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و فاز متحرک استونیتریل-آب (۸۲:۱۸) انجام گرفت (Liu et al., 2014).

در سال ۲۰۱۳ فو^۳ و همکاران، پلی ساکارید محلول در آب ریشه گون ممبراناسه از طریق استخراج با آب داغ (۶۰ °C) جداسازی کردند. خالص سازی از طریق ترسیب با اتانول، رزین AB-8 و ستون سفادکس جی ۱۰۰ انجام گرفت (Fu et al., 2013).

^۱ Li
^۲ Liu
^۳ Fu

لی و همکاران در سال ۲۰۱۰ به مطالعه بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی پلی ساکارید گون پرداختند. در این مطالعه پلی ساکارید گون با استفاده از HPLC و FT-IR آنالیز شد. باندهای جذبی در ۱۶۳۹ و 1538 cm^{-1} به ارتعاشات کششی پیوند C-O گروه کربوکسیل نسبت داده شده است و باندهای جذبی در ۱۰۳۵ و 956 cm^{-1} نشان دهنده مونومر پیران در ساختار بود. فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکارید گون توسط آنتی اکسیدان های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پلی ساکارید گون فعالیت آنتی اکسیدانی قوی در تمام روش های آزمایش نشان داد. علاوه بر فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکاریدها، فعالیت ضد سرطانی قوی نیز مشاهده شد. پلی ساکارید گون با ۲ مولار H_2SO_4 برای ۵-۶ ساعت در 121°C در لوله آزمایش شیشه‌ای مهر و موم شده هیدرولیز شد. پس از هیدرولیز کامل محتوی با BaCO_3 خنثی و فیلتر شد. ترکیبات مونوساکاریدی هیدرولیز شده توسط HPLC با استفاده از ژل Supelco 610-H ستون ($30\text{ cm} \times 7/8\text{ mm}$) و دتکتور (۲۴۱۴) RI با سرعت جریان ۰/۴ میلی لیتر بر دقیقه در دمای 30°C و فاز متحرک $0.1\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ در آب تعیین شد. تقارن نسبی سطح پیک برای تعیین ترکیب مونوساکارید محاسبه شد و در آنالیز HPLC پلی ساکارید ترکیب پیک اصلی توسط سیستم LSD شناسایی گردید (Li et al., 2010).

ژو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه بر روی آنالیز ساختار و فعالیت ضد سرطانی پلی ساکارید ریشه گون مغولستانی، دو پلی ساکارید محلول در آب APS1 و APS2 را ۳ مرتبه توسط محلول کلسیم (۳ ml، ۳۰۰، ۹-۱۰ pH) به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 100°C پس از تصفیه های پی در پی از طرق ترسیب با استفاده از اتیل الکل فیلتراسیون از طریق DEAE-سفادکس ای-۲۵ و سفادکس جی ۱۰۰ جداسازی کردند (Zhu et al., 2011).

نیو^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۱ در طی مطالعه ساختار و فعالیت زیستی پلی ساکارید ریشه گون ممبرانسه وارپته مغولستانی ۱۰۰ گرم از ریشه گون ممبرانسه را در ۶۰۰ میلی لیتر آب داغ (80°C) برای ۲ ساعت

^۱ Zhu

^۲ Niu

(۲ بار) استخراج کردند. پروتئین توسط روش سواگ حذف شد و ترسیب توسط افزودن اتانول ۹۵٪ در 4°C برای ۸ ساعت و سپس سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس خالص سازی پلی ساکارید خام از طریق ستون سلولزی DEAE و ستون سفاکریل -اس ۴۰۰ انجام گرفت (Niu et al., 2011).

در طی مطالعات ژاؤ^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۱ پلی ساکارید گون ممبراناسه از طریق استخراج با آب در دمای 90°C به مدت ۴ ساعت (۲ مرتبه)، ترسیب با الکل، کروماتوگرافی نفوذ ژل و اولترافیلتراسیون استخراج شد (Zhao et al., 2011).

جیانگ^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۰ به مطالعه بر روی پلی ساکارید گون ممبراناسه واریته مغولستانی پرداختند. تخلیص پلی ساکارید توسط اولترافیلتراسیون و روش جذب رزین (DEAE-سفاروز) انجام گرفت. میزان پلی ساکارید در استخراج توسط روش فنول-اسید سولفوریک ۹۸/۲٪ اندازه گیری شد (Jiang, J, et al., 2010).

در سال ۲۰۱۰ یان^۳ و همکاران پلی ساکارید گون مغولستانی را از شرکت بیوشیمیایی جینگ لین^۴ با خلوص ۹۸٪ تهیه کردند و فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها را بررسی کردند. گروه های پلی ساکاریدی توسط FTIR و GC آنالیز شدند (Yan et al., 2010).

در سال ۲۰۰۹ لی و همکاران به مطالعه روی فعالیت ضدسرطان پلی ساکارید ریشه گون ممبراناسه پرداختند. آن ها ۳۰۰ گرم ریشه گون را در (۲ لیتر) آب مقطر در 100°C به مدت ۲ ساعت استخراج کردند. پروتئین ها توسط روش سواگ حذف شدند سپس اتانول جهت ترسیب پلی ساکارید در دمای 4°C افزوده شد. پس از سانتریفیوژ ۲۵ گرم پلی ساکارید خام به دست آمد. خالص سازی پلی ساکارید

^۱ Zhao

^۲ Jiang

^۳ Yan

^۴ JingLin

مذکور با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و سفادکس-جی ۱۰۰ انجام گرفت (Li et al., 2009).

لی و همکاران در سال ۲۰۰۷ به مطالعه بر روی اثر پلی ساکارید محلول در آب ریشه گون ممبراناسه بر روی گلومرولونفریت موش پرداختند. بررسی‌های آن‌ها نشان داد پلی ساکارید حاصل از -D گلوکوپیرانوز تشکیل شده است. وزن مولکولی پلی ساکارید مذکور $4 \times 10^4 \times 3/6$ دالتون بود (Li et al., 2007).

ژو^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو پلی ساکارید محلول در آب از ریشه گیاه گون به دست آوردند. استخراج پلی ساکاریدها به مدت ۵ ساعت در آب جوش انجام گرفت. خالص سازی از طریق ترسیب با اتانول، پروتئین زدایی و کروماتوگرافی فیلتراسیون-ژل و تبادل یونی صورت گرفت. وزن مولکولی توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی نفوذ ژل تعیین شد (Xu, 2008).

در سال ۲۰۰۶ وانگ^۲ و همکاران هتروپلی ساکارید محلول در آب گون ممبراناسه را توسط آب داغ استخراج و با استفاده از ترسیب کسری، ستون کروماتوگرافی DEAE-سفادکس ای-۲۵ و سفادکس جی-۱۰۰ خالص سازی کردند (Wang et al., 2006).

محمدی فر و همکاران در سال ۲۰۰۶ خواص محلول کتیرا (بخش محلول در آب صمغ کتیرا از گون گوسپینوس^۳) را با استفاده از کروماتوگرافی ژل تراوا (GPC) بررسی کردند. در این پژوهش از طیف سنجی همبستگی فوتون^۴ برای تعیین شعاع هیدرودینامیک و تخریب التراسونیک برای به دست آوردن وزن مولکولی متفاوت از بخش پلیمرهای زیستی استفاده شد (Mohammadifar et al., 2006).

^۱ Xu

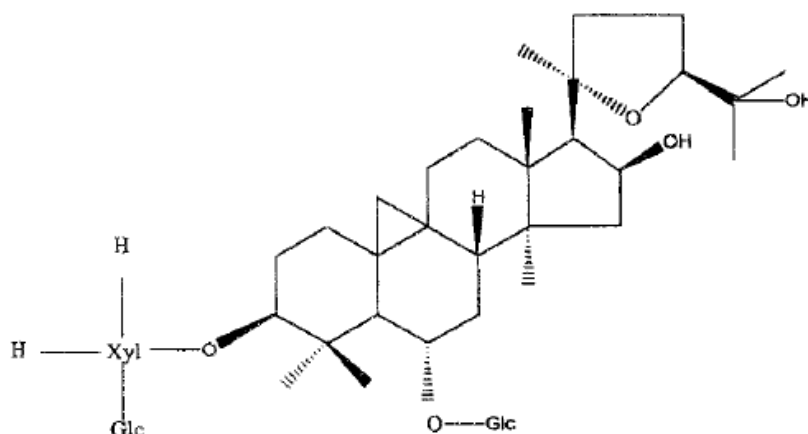
^۲ Wang

^۳ Gossypinus

^۴ Photon correlation spectroscopy

شآو^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۴ پلی ساکارید ریشه گون ممبراناسه را ۳ بار در آب جوش استخراج کردند. خالص سازی توسط ستون سفاسل و دی اتیل آمینو اتیل سلولز صورت گرفت (Shao et al., 2004).

دو^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۳ به مطالعه بر روی Astragaloside IV (شکل ۲-۱) و تولید پلی ساکارید محلول در آب توسط ریشه کرک دار گون ممبراناسه در بیوراکتورها پرداختند. ریشه گون ممبراناسه در بیوراکتورهایی بالای ۳۰ لیتر برای مدت ۲۰ روز رشد داده شد. پلی ساکارید بازده مشابهی در میان بیوراکتورهای مختلف (محدوده ۲۵-۳۲ میلی گرم) نشان داد. محتوی تشکیل دهنده فعال سلول ها از عصاره های گیاهی، نشان داد که کشت ریشه گون ممبراناسه در مقیاس بزرگ دارای پتانسیلی برای ارائه یک جایگزین برای کاشت محصولات بدون به خطر انداختن عملکرد دارویی دارد (Du et al., 2003).



شکل ۲-۱: ساختار شیمیایی Astragaloside IV (Du et al., 2003).

۲-۲- شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها

فو و همکاران در سال ۲۰۱۳ از طریق نتایج کروماتوگرافی گازی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گون ممبراناسه وارسته مغولستانی به این نتیجه رسیدند که از واحدهای L-رامنوز، D-زایلوز، D-گلوکز و

^۱ Shao

^۲ Du

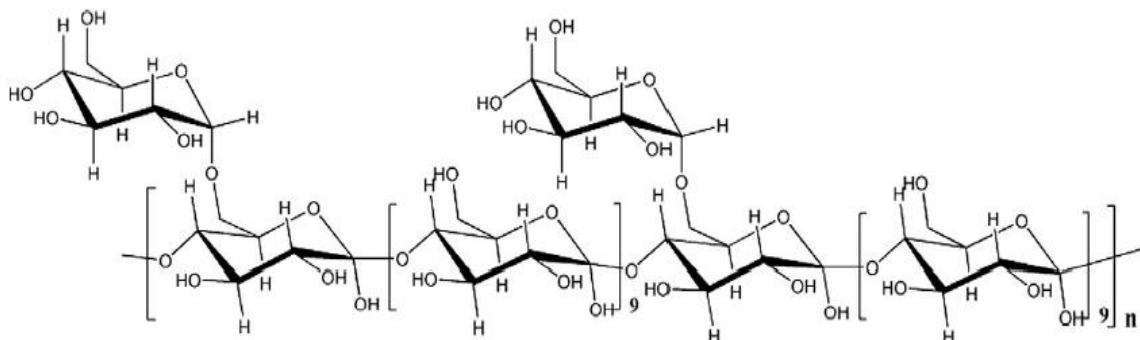
D- گالاکتوز با نسبت مولی ۱:۴:۵:۱/۵ تشکیل شده است. وزن مولکولی پلی ساکارید، $10^5 \times 3/01$ و از طریق کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با کارایی بالا به دست آمد. نتایج آنالیز طیف 1H NMR و ^{13}C NMR نشان داد که زنجیره اصلی خطی است. زنجیره اصلی از پیوندهای بتا- (۱→۳) گالاکتوز تشکیل شده است و شاخه‌های جانبی در کربن شماره ۶ گالاکتوز متشکل از گلوکز، رامنوز، زایلوز و گالاکتوز است (Fu et al., 2013).

در سال ۲۰۱۱ لی و همکاران روی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی پلی ساکارید گون مطالعه کردند. آن‌ها ۶ ترکیب استاندارد را در آنالیز HPLC مقایسه کردند و دریافتند پلی ساکارید از واحدهای گلوکز تشکیل شده است. آلفا- (۱→۴) گلوکان به عنوان ترکیب اصلی در عصاره پلی ساکارید شناسایی شد (Li et al., 2010).

در طی مطالعات ژو و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی آنالیز ساختار و فعالیت ضد سرطانی پلی ساکارید گون، دو پلی ساکارید محلول در آب APS1 و APS2 با وزن مولکولی به ترتیب $10^6 \times 4/77$ و $10^3 \times 8/68$ دالتون را استحصال و خالص سازی کردند. ترکیب اصلی زنجیر دو پلی ساکارید مونومرهای گلوکز به همراه مقدار کمی آرابینوز، زایلوز به ترتیب با نسبت‌های مولی $0/54 : 1 : 18/14$ و $0/23 : 1 : 29/39$ بود. آن‌ها از FTIR، متیلاسیون، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت و همچنین 1H NMR و ^{13}C NMR برای آنالیز ساختار استفاده کردند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان داد که ساختار دو پلی ساکارید مشابه است. ترکیب اصلی زنجیر پلی ساکاریدی از واحدهای گلوکزی آلفا ۱ به ۳ و میزان کمی آلفا گلوکز ۱ به ۴ و آلفا گلوکز ۱ به ۶ تشکیل شده بود درحالی که در زنجیر جانبی آرابینوز و زایلوز وجود داشت (Zhu et al., 2011).

نیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی ساختار و فعالیت زیستی پلی ساکارید گون ممبراناسه واریته مغولستانی مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که پلی ساکارید موجود از آلفا D- گلوکز با وزن مولکولی $10^4 \times 2/07$ دالتون تشکیل شده است و آنالیز اکسیداسیون پریودات، $1D$ و $2D$ NMR نشان داد که

پلی ساکارید مذکور از واحدهای ۱ به ۴ در زنجیر اصلی و ۱ به ۶ در شاخه به ازای هر ۱۰ گلوکز در زنجیر اصلی وجود دارد. ساختار پلی ساکارید شناسایی شده توسط آن‌ها در شکل ۲-۲ آمده است (Niu et al., 2011).



شکل ۲-۲: ساختار پلی ساکارید گون ممبراناسه (Niu et al., 2011).

ژاؤ و همکاران در سال ۲۰۱۱ طی بررسی پلی ساکارید گون ممبراناسه دریافتند که پلی ساکارید از گلوکز با وزن مولکولی $10^4 \times 6/9$ دالتون تشکیل شده است (Zhao et al., 2011).

در سال ۲۰۱۱ لیو و همکاران با مطالعه بر روی فعالیت ایمنی پلی ساکارید محلول در آب گیاه گون مغولستانی دریافتند که پلی ساکارید از واحدهای منوساکاریدی گلوکز، آرابینوز، گالاکتوز و رامنوز؛ در اسکلت ساختار اصلی با اتصالات آلفا گلوکان (۱ به ۴) (۱ به ۶)، پلی ساکاریدهای آرابینوز-گالاکتوز، پلی ساکاریدهای رامنوز-اسید گالاکتورونیک، تشکیل شده‌اند (Liu et al., 2011).

جیانگ و همکاران در سال ۲۰۱۰ پلی ساکارید گون ممبراناسه واریته مغولستانی را بررسی کردند. وزن مولکولی پلی ساکارید به وسیله کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل با کارایی بالا $10^4 \times 1/1$ دالتون تخمین زده شد. ترکیبات منوساکاریدی توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا آنالیز گردید و مشخص شد که از واحدهای مونومری رامنوز، گلوکز، گالاکتوز و آرابینوز به ترتیب با نسبت ۱/۱۹: ۷۲/۰۱: ۵/۸۵: ۲۰/۹۵ تشکیل شده است (Jiang et al., 2010).

در سال ۲۰۱۰ یان و همکاران پلی ساکارید محلول در آب گون مغولستانی و فعالیت آنتی اکسیدانی آن را مطالعه کردند. بر طبق نتایج به دست آمده پلی ساکارید از ۴ قند گلوکز، گالاکتوز، مانوز و آرابینوز تشکیل شده بود که مانوز ترکیب اصلی شناخته شد. حضور باند $C=C$ آروماتیک در طیف مادون قرمز (1600 cm^{-1}) به وجود پلی فنول ها را نشان داد. حضور باند قوی $O-H$ و $C=O$ به حلقه فوران نسبت داده شده است. آزمایش های دارویی نشان داد که پلی ساکارید گون مغولستانی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کبد و سرم خون را به طور قابل توجهی افزایش و سطح چربی پراکسید را کاهش می دهد. نسبت مولی مونوساکاریدها $0.0992 : 0.126 : 0.100 : 0.115$ (آرابینوز: مانوز: گلوکز: گالاکتوز) محاسبه شد (Yan et al., 2010).

مطالعات اولن نیکو^۱ و روخین^۲ در سال ۲۰۱۰ بر روی پلی ساکاریدهای دانه گون سیسر^۳ نشان داد که پلی ساکارید مذکور حاوی یک گالاکتومانان ($5/90\%$ از جرم دانه) با ویسکوزیته بالای $925/5$ میلی لیتر بر گرم، وزن مولکولی 1064 کیلو دالتون و فعالیت نوری $71/9 +$ است. گالاکتومانان از واحدهای گالاتوز و مانوز با نسبت های $1:1/39$ تشکیل شده بود. آن ها با روش های فیزیکی و شیمیایی نشان دادند که زنجیر اصلی پلی ساکارید شامل 1 و 4 بتا D -مانوپیرانوز است که در کربن 6 به وسیله یک واحد آلفا D -گالاکتوپیرانوز جانشین شده است. واحد $Man-Man$, $(Gal)Man-Man/Man-Man(Gal)$ and $(Gal)Man-Man(Gal)$ به ترتیب در گالاکتومانان $61/5$ ، $19/8$ و $18/7\%$ بود. نتایج گالاکتومانان متیله شده نشان داد که محتوی 2 ، 3 ، 4 ، 6 ، تترا- O -متیل گالاکتوپیرانوز؛ 2 ، 3 ، دی- O -متیل مانوپیرانوز و 2 ، 3 ، 6 ، تری- O -متیل مانوپیرانوز در نسبت های مولی $2/58$ ، $2/56$ ، 1 است (Olennikov and Rokhin, 2010).

در سال ۲۰۱۰ لیو و همکاران با مطالعه روی پلی ساکارید گون ممبراناسه واریته مغولستانی پلی ساکاریدهای $APSI$ ، $APSI$ و $APSI$ با نسبت های $1/47$ ، $1/21$ ، 1 استخراج و خالص سازی کردند.

^۱ Olennikov

^۲ Rokhin

^۳ Cicer

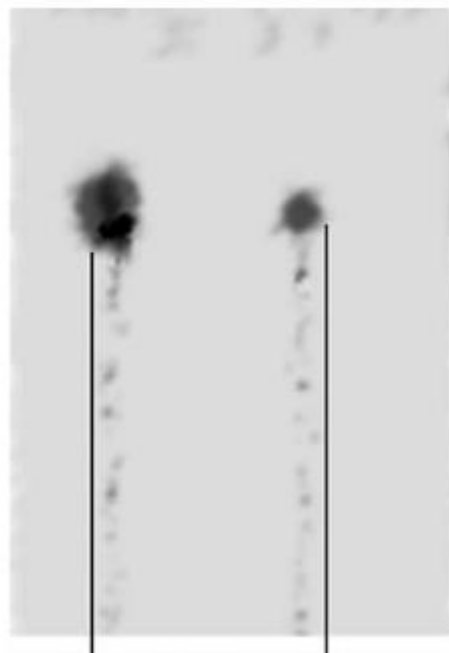
APSI از D-گلوکز، D-گالاکتوز و L-آرابینوز با نسبت‌های مولی ۱/۷۵، ۱/۶۳، ۱ و وزن مولکولی ۳۶/۳۰۰ کیلو دالتون تشکیل شده است. APSII و APS III دکستران بوده و از آلفا (۱ به ۴) و میزان کمی آلفا (۱ به ۶) تشکیل شدند (Liu et al., 2010).

جیانگ و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه روی پلی‌ساکارید گون ممبراناسه واریته مغولستانی توسط کروماتوگرافی گازی نشان دادند که پلی‌ساکارید از واحدهای مانوز، گالاکتوز، فروکتوز، فوکوز و گزیلوز تشکیل شده است. با توجه به نتایج طیف‌سنجی مادون‌قرمز و ماورا بنفش، پیوند شیمیایی اصلی این ترکیبات به‌صورت آلفا و بتا بود (Jiang et al., 2010).

لی و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پلی‌ساکارید ریشه گون ممبراناسه با استفاده از HPLC و FTIR مطالعه کردند. آن‌ها نشان دادند که پلی‌ساکارید تنها از واحدهای مونومری گلوکز با پیوند آلفا ۱ به ۴ گلوکان تشکیل شده است (Li et al., 2010).

ساختار اولیه پلی‌ساکارید محلول در آب حاصل از ریشه گون ممبراناسه توسط لی و ژانگ در سال ۲۰۰۹ بررسی شد. آن‌ها دریافتند که وزن مولکولی پلی‌ساکارید $10^4 \times 3/6$ دالتون است. بررسی ساختار پلی‌ساکارید مذکور با استفاده از روشهای آنالیز شیمیایی و دستگاهی نظیر طیف‌سنج NMR، مادون‌قرمز، GLC-MS، آنالیز متیلاسیون و اکسیداسیون پریودات نشان دادند که ساختار اصلی پلی‌ساکارید در طول زنجیر اصلی یک آلفا (۱ به ۴) D-گلوکان است که به ازای ۹ واحد گلوکز، یک آلفا D-گلوکز بر روی کربن شماره ۶ زنجیر قرار دارد (Li and Zhang, 2009).

در سال ۲۰۰۹ لی و همکاران با مطالعه روی فعالیت ضدسرطان پلی‌ساکارید ریشه گون ممبراناسه و شناسایی و تعیین ساختار آن، دریافتند که از واحدهای گلوکز با وزن مولکولی $10^4 \times 3/6$ دالتون تشکیل شده است. روش HPLC و IR برای تعیین کمی و کیفی پلی‌ساکارید استفاده شد. آن‌ها نشان دادند که پلی‌ساکارید از یک آلفا (۱ به ۴) D-گلوکان با زنجیر جانبی آلفا (۱ به ۶) به موقعیت O-۶ تشکیل شده است. در شکل ۲-۳ آنالیز TLC این پلی‌ساکارید نشان داده شده است (Li et al., 2009).



گلوکز پلی ساکارید

شکل ۲-۳: آنالیز TLC پلی ساکارید ریشه گون ممبرانسه (Li et al., 2009).

اولن نیکو و روخین در سال ۲۰۰۹ یک گالاکتومانان با وزن مولکولی ۷۲۴ کیلو دالتون و فعالیت نوری $73/1 +$ و ویسکوزیته $471/1$ میلی لیتر بر گرم از دانه گون دانیکوس^۱ جداسازی کردند. پلی ساکارید مذکور از واحدهای گالاکتوز و مانوز با نسبت های $1/40$ تشکیل شده بود. زنجیر اصلی $1,4$ بتا D-مانوپیرانوز بود که در محل کربن ۶ یک واحد آلفا D-گالاکتوپیرانوز حضور داشت (Olennikov and Rokhin, 2009).

در سال ۲۰۰۸ اولن نیکو و روخین به مطالعه روی دانه گون سریکوکانوس^۲ پرداختند. آن ها یک گالاکتومانان ($3/58$ ٪ از جرم دانه) با ویسکوزیته بالای $764/6$ میلی لیتر بر گرم، فعالیت نوری $65/3 +$ و وزن مولکولی ۸۷۶ کیلودالتون استخراج و خالص سازی کردند. پلی ساکارید مذکور از گالاکتوز و مانوز با نسبت $1/58$: 1 تشکیل شده بود. زنجیر اصلی گالاکتومانان 1 به 4 بتا D-مانوپیرانوز بود که در محل کربن شماره ۶ یک واحد آلفا D-گالاکتوپیرانوز حضور داشت. طیف سنجی ^{13}C NMR نشان داد که

^۱ Danicus

^۲ Sericeocanus

گالاکتومانان از واحدهای مانوز-مانوز، (گالاکتوز)مانوز-مانوز، و یا مانوز-مانوز(گالاکتوز) بعلاوه (گالاکتوز)مانوز-مانوز(گالاکتوز) با نسبت ۰/۱۵ : ۰/۵۱ : ۰/۳۴ تشکیل شده است (Olennikov & Rokhin, 2008).

ژو و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو پلی ساکارید محلول در آب (APSI و APSII) از ریشه های گیاه گون استخراج و خالص سازی کردند. ترکیب منوساکاریدها به وسیله HPLC و TLC با استفاده از ستون NH₂ و RI آنالیز شد نتایج آن ها نشان داد که APS-I از واحدهای آرابینوز و گلوکز به ترتیب با نسبت ۱:۳/۴۵ و APS-II از واحدهای رامنوز، آرابینوز و گلوکز به ترتیب با نسبت ۱:۶/۲۵:۱۷/۸۶ تشکیل شده است. وزن مولکولی APS-I و APS-II به ترتیب ۱/۶۹۹/۱۰۰ دالتون و ۱/۱۹۷/۶۰۰ به دست آمد (Xu et al., 2008).

مطالعات لی و همکاران در سال ۲۰۰۷ روی پلی ساکارید گون نشان داد که از واحدهای D-گلوکوپیرانوز تشکیل شده است. وزن مولکولی پلی ساکارید مذکور $10^4 \times 3/6$ دالتون و اتصالات زنجیر اصلی آن ۱ به ۴ بود (Li et al., 2007).

وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ یک هترو پلی ساکارید از ریشه گیاه گون ممبراناسه استخراج کردند. نتایج مطالعات ساختاری آن ها نشان داد که پلی ساکارید خالص از نوع اسیدی است. میزان اسید ارونیک ۸۴/۲٪ بود و آنالیز ترکیبات قندی نشان داد که پلی ساکارید مذکور از واحدهای آرابینوز، رامنوز، گالاکتوز و گلوکز به ترتیب با نسبت های مولی، ۲:۲:۵ و ۶ تشکیل شده است (Wang et al., 2006).

در سال ۲۰۰۴ شآو و همکاران با مطالعه پلی ساکارید ریشه گون ممبراناسه یک پلی ساکارید محلول در آب با وزن مولکولی $10^6 \times 1/58$ دالتون توسط روش فیلتراسیون ژل تعیین استخراج کردند. آنالیز ترکیبات قندی توسط TLC و کروماتوگرافی گازی نشان داد که از واحدهای رامنوز، زایلوز، گلوکز، گالاکتوز، مانوز و فورانوز با نسبت های مولی ۴/۹:۴/۷:۸/۳:۱۲۲/۲:۲/۲:۳/۱ تشکیل شده است (Shao et al., 2004).

لیو و همکاران در سال ۲۰۰۳ به مطالعه روی فعالیت ضد ایدز پلی ساکارید محلول در آب از ریشه گون ممبراناسه پرداختند. آن‌ها دریافتند که پلی ساکارید مذکور از واحدهای گلوکز با وزن مولکولی 1.46×10^4 دالتون تشکیل شده است. آن‌ها ساختار اصلی پلی ساکارید را به صورت آلفا (۱ به ۴) گلوکان و به میزان کمتری بتا (۱ به ۴ گلوکان) تعیین کردند (Liu et al., 2003).

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱- مواد اولیه و محلول‌های شیمیایی

۳-۱-۱- جمع‌آوری ریشه گیاه گون نوک خمیده

ریشه گیاه در فاصله زمانی اردیبهشت تا خرداد ۱۳۹۴ از منطقه اکراسر واقع در ارتفاعات مناطق کوهستانی شهرستان رامسر جمع‌آوری شد. ریشه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در مجاورت با هوا خشک و در دمای اتاق نگهداری شدند. شناسایی گونه گون (گون نوک خمیده) توسط دکتر ولی‌الله مظفریان، گیاه‌شناس معروف، انجام شد. قبل از انجام آزمایش به‌منظور جدا کردن سایر مواد خارجی چسبیده به بخش بیرونی ریشه‌های گیاه، پوسته خارجی آن‌ها ابتدا توسط چاقو تمیز و گرد و خاک و سایر مواد اضافی جدا شد. ریشه‌ها سپس به ابعاد حدود ۱ سانتی‌متر خرد شدند.

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

دکستران با اوزان مولکولی متفاوت (۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون)، دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس جی ۱۰۰ از شرکت فارماسیا^۱ _اِپسالا^۲، سوئد^۳ خریداری شدند. استاندارد مونوساکاریدهای خالص (د-مانوز، D-رامنوز، D-گلوکز، D-گالاکتوز، L-آرابینوز و اسید L-گالاکتورونیک) و دی متیل سولفوکساید و DSS^۴ از شرکت‌های سیگما^۵ آلمان و مرک^۶ آلمان تهیه شدند. اسید تری فلورو استیک از شرکت فلوکا^۷ خریداری شد. دیگر مواد شیمیایی آزمایش نظیر انواع اسیدها، بازها و صافی‌ها و ... از درجه خلوص آزمایشگاهی برخوردار بودند.

^۱ Pharmacia

^۲ Uppsala

^۳ Sweden

^۴ 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonic acid

^۵ Sigma

^۶ Merck

^۷ Fluka

۳-۲- دستگاه‌های مورد استفاده

سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ rpm و قابل کاربرد در مقیاس حجمی بالا (۱ لیتری) ساخت شرکت اپندورف^۱، آلمان. تبخیرکننده دورانی همراه با پمپ‌های خلأ (ساخت شرکت هیدلف^۲ آلمان). ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم (ساخت شرکت ای اند دی ژاپن^۳)، دستگاه پلاریمتر (پرکین المر^۴ ۳۴۳ ساخت کشور آمریکا). اسپکتروفتومتر واریان کری ۱۰۰- بیو^۵ ساخت کشور آمریکا. طیف‌سنج مادون قرمز، نیکولت^۶ ۵۷۰۰ ساخت کشور آمریکا.

کروماتوگرافی گازی واریان^۷ ۳۴۰۰ ساخت کشور آمریکا. کروماتوگرافی غربال مولکولی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو^۸) همراه با ستون ژل - تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال^۹ ساخت توسو^{۱۰} ژاپن. طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای مدل بروکر آوی - ۵۰۰^{۱۱} ساخت کشور آلمان. کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی مدل اچ پی^{۱۲} ۵۸۹۰ ساخت کشور آمریکا.

از سایر وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش می‌توان به انواع ستون‌های کروماتوگرافی، کیسه دیالیز با Cut off ۲/۵ کیلو دالتون، آون معمولی و کیف بوخنر، کاغذهای صافی، دسیکاتور، همزن‌ها و مغناطیسی^{۱۳} مجهز به سیستم حرارتی، سونیکاتور (اولتراسونیک)، بن ماری (حمام آب گرم) و دکانتور اشاره کرد.

^۱ Eppendorf

^۲ Heidolph

^۳ A & D

^۴ Erkin-Elmer

^۵ Varin Cary100-Bio

^۶ Nicolet

^۷ Varian

^۸ Shimadzu

^۹ TSK-GEL G3000 PWXL

^{۱۰} Tosoh

^{۱۱} Bruker AV-500

^{۱۲} HP

^{۱۳} Megnetic stirrer

۳-۳-۳- روش کار

۳-۳-۱- استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه گون نوک خمیده

۳-۳-۱-۱- حذف مواد چربی دوست

جهت حذف رنگ‌ها و مواد چربی دوست، ساپونین‌ها و نیز مونوساکاریدها از اتانول ۹۵٪ (به نسبت ۱ قسمت ریشه به ۱۰ قسمت اتانول) در دمای جوش به مدت ۱۰ ساعت استفاده شد. برای انجام بهتر کار، هر ۳ ساعت یکبار اتانول استفاده شده با اتانول تازه جایگزین شد. در نهایت ریشه‌های گیاهی شستشو داده شده با اتانول، در مجاورت با هوا خشک شدند.

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

عمل جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب از ۱۰۰ گرم نمونه گیاهی خشک شده پس از شستشو با اتانول توسط ۱ لیتر آب گرم (60°C) به مدت ۱۰ ساعت انجام گرفت. این مرحله ۳ بار تکرار شد و در نهایت عصاره آبی به دست آمده از هر مرحله با یکدیگر ترکیب شدند.

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

برای جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب باید ابتدا پروتئین‌ها از عصاره آبی جدا شوند که این عمل به روش‌های مختلفی انجام می‌گیرد. در این پژوهش از روش متداول معرف سواگ (۱- بوتانول و کلروفرم) استفاده شد. میزان کلروفرم افزوده شده ۲۰٪ حجم عصاره آبی و ۱- بوتانول نیز ۲۰٪ حجم کلروفرم مصرفی بود. پس از انجام عملیات همزنی که به مدت نیم ساعت انجام گرفت، سانتریفیوژ کردن عصاره آبی - الکلی توسط سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm و مدت زمان ۴ دقیقه انجام گرفت. در نهایت عصاره آبی فاقد پروتئین از بخش فوقانی جدا شد.

ترسیب پلی ساکاریدها از عصاره آبی پروتئین زدایی شده با افزودن اتانول ۹۵٪ (به میزان ۳ برابر حجم عصاره) انجام شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت در شرایط دمای 4°C ، محلول حاوی اتانول به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلی ساکاریدهای محلول در آب از محلول آبی - الکلی جدا شد و بر روی کاغذ صافی قرار

گرفت. شست‌وشوی نهایی توسط اتانول مطلق انجام گرفت و پلی‌ساکاریدها توسط تبخیرکننده دورانی تحت خلأ در بالن حجمی خشک شدند.

۳-۳-۲- خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها

شناسایی پلیمرهای کربوهیدراتی، بیش از همه به جداسازی و خالص‌سازی پلیمر از منبع اصلی آن بستگی دارد. ماهیت پلی‌ساکارید، ترکیبات شیمیایی، ساختار مولکولی، وزن و حلالیت آن‌ها را به مقدار زیادی تحت تأثیر قرار می‌دهد. باید ذکر کرد که وجود هرگونه ناخالصی در نمونه مورد آزمایش احتمال دارد که اطلاعات نادرستی جهت شناسایی و تعیین ساختار آن به پژوهشگران داده و آن‌ها را گمراه نماید. بنابراین تولید پلی‌ساکارید کاملاً خالص که مناسب آزمایش‌های شناسایی و تعیین ساختار باشد از اهمیت بالایی برخوردار است.

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

جهت خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، ابتدا ۰/۰۹۱ گرم پلی‌ساکاریدهای خام حاصل از مرحله‌ی استخراج در حجم کمی از آب مقطر حل شد و سپس از ستون کروماتوگرافی حاوی دی اتیل آمینو اتیل سلولز عبور داده شد.

قبل از استفاده کردن از دی اتیل آمینو اتیل سلولز، انجام یکسری مراحل برای آماده‌سازی آن ضروری است. در صورتی که این مراحل به‌درستی انجام نشود ممکن است مقداری از مواد سلولزی وارد فراکشن‌های شسته شده از ستون شده و در شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدها مزاحمت ایجاد کند.

در ابتدا دی اتیل آمینو اتیل سلولز خشک به ترتیب توسط اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال و سود ۰/۵ نرمال در داخل یک بشر به‌صورت دوغاب در آمده و سپس در داخل یک دسیکاتور تحت خلأ قرار داده شده تا ته‌نشین شود. دسیکاتور تحت خلأ وظیفه خروج حباب‌های هوای به دام افتاده در بین مواد سلولزی که ممکن است سبب شکسته و تکه‌تکه شدن این مواد در داخل ستون شود، را بر عهده دارد. این فرآیند

توسط اسیدکلریدریک و سود انجام می‌شود و هر مرحله محلول کدر رویی جداشده و دور ریخته می‌شود و دی اتیل آمینو اتیل سلولز رسوب کرده در یک قیف بوخنر توسط آب مقطر شسته می‌شود. سپس دی اتیل آمینو اتیل سلولز وارد ستون کروماتوگرافی می‌شود. عمل شست‌وشوی ستون توسط آب مقطر چندین مرتبه تکرار شده و بعد از متراکم شدن مواد سلولزی در داخل ستون، آماده جهت انجام مراحل خالص‌سازی پلی‌ساکارید موردنظر می‌شود.

پلی‌ساکارید خام پس از حل شدن در آب مقطر وارد ستون شد و شست‌وشوی ستون به ترتیب توسط آب مقطر و NaCl با گرادیان غلظت صفر تا یک مولار انجام گرفت. فراکشن‌گیری از ستون در لوله‌های مجزا و کنترل فراکشن‌گیری توسط روش فنل-اسید سولفوریک انجام شد. در ادامه به ۱ سی سی از فراکشن‌های حاصل از ستون، ۵ سی سی اسیدسولفوریک غلیظ و ۱ سی سی فنل اضافه شد. فراکشن‌های جمع‌آوری‌شده از ستون دی اتیل آمینو اتیل سلولز جهت انجام مراحل خالص‌سازی بیشتر وارد ستون کروماتوگرافی ژل تراوای سفادکس جی -۱۰۰ (۱/۶ سانتی‌متر × ۷۰ سانتی‌متر) شدند. عمل شست‌وشوی ستون مذکور با استفاده از آب یون‌زدایی شده با سرعت جریان حجمی ۱۰ میلی‌لیتر بر ساعت انجام شد و در نهایت فراکشن پلی‌ساکارید اصلی (غالب) جمع‌آوری و سپس خشک شد. پلی‌ساکارید محلول در آب خالص و سفیدرنگ حاصل برای مطالعات بعدی شناسایی و تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳-۳- شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدهای محلول در آب گون نوک خمیده

همان‌طور که قبلاً ذکر شد فراکشن پلی‌ساکارید غالب حاصل از ستون‌های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس جی -۱۰۰، کاملاً خالص و سفیدرنگ بود و تحت عنوان پلی‌ساکارید محلول در آب جهت مطالعات شناسایی و تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت. در زیر به شرح روش‌های مورد استفاده برای شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکارید غالب حاصل از ریشه‌های گون نوک خمیده می‌پردازیم.

۳-۳-۱- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید غالب حاصل از ریشه های گون نوک

خمیده

همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب توسط روش کروماتوگرافی روی ستون سفادکس جی ۱۰۰ و کروماتوگرافی ژل تروا با کارایی بالا، با مشخصات سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همراه با ستون ژل - تی اس کا- جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال ساخت توسو ژاپن ($7/8 \times 300$ میلی متر) انجام شد. شست و شوی ستون توسط محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم با سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه صورت گرفت و آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست نور مدل RID-۱۰ A (شیمادزو، ژاپن) بود. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی مشخص (۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۷۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰۰ دالتون) به دست آمد و دمای ستون در طول آزمایش 40°C بود. وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از منحنی کالیبراسیون ذکر شده در بالا محاسبه شد (Sun et al. 2010).

۳-۳-۲- طیف سنج مادون قرمز

طیف سنج مادون قرمز پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از طیف سنج مادون قرمز مدل نیکولت ۵۷۰۰ (مدیسون آمریکا) به دست آمد. روش کار بدین صورت بود که پلی ساکارید کاملاً خالص (۱-۲ میلی گرم) با پودر برومور پتاسیم (درجه خلوص اسپکتروسکپی) مخلوط و پس از فشرده شدن به صورت قرص ۱ میلی متری مناسب برای دستگاه طیف سنج مادون قرمز در آمد و در نهایت نمودار تغییرات درصد نور عبور داده شده بر حسب فرکانس در محدوده 400 cm^{-1} تا ۴۰۰۰ رسم شد (Ray, 2006).

۳-۳-۳- تعیین درجه چرخش نوری

اندازه گیری چرخش ویژه به منظور تشخیص محلول های قندی ناشناخته و اثبات تغییر پذیری چرخش و فعالیت نوری استفاده می شود. استفاده از پلاریمترها به منظور اندازه گیری غلظت قندها، محدود به محلول های قند خالص است و برای ترکیب قندهای مختلف کاربرد ندارد. پلاریمترها (که همچنین تحت

عنوان ساکاریمتر شناخته می‌شود) از اواسط قرن نوزدهم در کارخانه‌های تصفیه‌شکر به‌منظور اندازه‌گیری غلظت قند مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Wrolstad, 2012).

برای تعیین درجه چرخش نوری در این پژوهش از دستگاه پلاریمتر پرکین المر ۳۴۳ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در حمام آب جوش به مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد. سپس ۵ میلی گرم پلی ساکارید هیدرولیز شده در یک بالن ژوژه ۵ میلی لیتری به حجم رسانده شد و وارد لوله ۲ دسی متری دستگاه گردید. اندازه‌گیری در دمای ۲۰°C و طول موج ۵۸۹ نانومتر انجام گرفت و در نهایت عدد خوانده شده از دستگاه در رابطه زیر قرار داده شد و میزان درجه چرخش محاسبه گردید (Chaplin and Kennedy, 1994).

$$\alpha = \frac{\alpha'}{L \times C} \quad (3-6)$$

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

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

پروتئین‌ها در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش دارای جذب قوی هستند بنابراین عدم جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش، نشان‌دهنده عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید و عملکرد خوب در مراحل خالص سازی قبلی است. از این رو طیف فرابنفش برای اطمینان از عدم حضور بقایای پروتئینی و خلوص پلی ساکارید مورد استفاده قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که محلول از پلی ساکارید (غلظت مهم نیست) تهیه شد و وارد سلولی از جنس کوارتز گردید. سپس جذب آن در ناحیه ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر واریان کری ۱۰۰- بیو (ساخت کشور آمریکا) ثبت شد (Nielsen, 2010).

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

تعیین قند کل توسط روش فنل-اسید سولفوریک و با استفاده از د-گلوکز به عنوان استاندارد در طول موج ۴۹۰ نانومتر انجام گرفت و برای تعیین کمی و کیفی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید از کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳۴۰۰ (ساخت کشور آمریکا) استفاده بعمل آمد. ستون مورد استفاده از نوع موبینه^۱ مدل دی ام- ۲۳۳۰^۲ (۳۰ متر $\times$ ۰/۳۲ میلی متر $\times$ ۰/۲ میکرومتر) و آشکارساز مورد استفاده از نوع یونش شعله ای^۳ بود. دمای ستون در 120°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای 250°C (با نرخ 8°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در همین دما نگهداری شد. ازت به عنوان گاز حامل با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت و دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب 250°C و 300°C بود. روش آماده سازی نمونه برای تزریق دستگاه به شرح رو به رو است: ابتدا ۲ میلی لیتر از محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک به ۱۵ میلی گرم پلی ساکارید در داخل لوله آزمایش اضافه شد. سپس لوله ها به صورت درب بسته در دمای 120°C به مدت ۲ ساعت حرارت دیدند. اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب 40°C حذف شد و نمونه هیدرولیز شده توسط ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم خنثی گردید. اسیدی کردن نمونه ها با استفاده از اسید استیک انجام گرفت و اسید بوریک اضافی با استفاده از متانول حذف شد. آلدیتول های حاصله با استفاده از مخلوط پیریدین-انیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام آب 90°C به مدت ۱ ساعت استیله شده و به استات های آلدیتول موبوطه تبدیل شدند. استات های آلدیتول مونوساکاریدهای استاندارد (د-گلوکز، د-گالاکتوز، ال-رامنوز، د-مانوز، ال-آرابینوز، د-زایلوز و ال-گالاکتورونیک) همراه با ۲ میلی گرم میو اینوزیتول (به عنوان استاندارد داخلی) همانند روش ذکر شده در بالا تهیه و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید (Chaplin and Kennedy, 1994; Chen et al., 2011).

^۱ Chapillary column

^۲ DM-2330

^۳ Flame- ionization

مقدار اسیدهای ارونیک با اندازه گیری میزان جذب در ۵۲۵ نانومتر مطابق روش رنگ سنجی به شرح زیر انجام شد:

به ۰/۴ ml اسید ارونیک (۵ تا ۲۰۰ nmol) یا قند خنثی (۵۰ nmol تا ۴ μ mol) در آب ۲/۴ ml اسیدسولفوریک تغلیظ شده به تنهایی یا حاوی حداکثر ۱۲۰ mM تترابورات سدیم اضافه شد. در برخی آزمایشات حداکثر تا ۱۶۰ μ l از ۴ مولار اسید سولفامیک- سولفامات پتاسیم (pH ۱/۶) به محلول قند اضافه شده و به طور کامل قبل از اضافه کردن اسید سولفوریک مخلوط شد. نمونه ها در حمام آب جوش برای ۲۰ دقیقه در لوله های ۶ میلی لیتری مهروموم شده برای جلوگیری از آلودگی نمونه حرارت دیدند. سپس لوله ها در حمام آب یخ سرد شدند و حداکثر تا ۱۵۰ μ l از معرف ام- هیدروکسی دی فنیل^۱ اضافه شد. لوله حاوی معرف ام- هیدروکسی دی فنیل در دمای محیط به مدت ۱۵ دقیقه تا یک ساعت قبل از اندازه گیری جذب انکوبه شد (Filisetti-Cozzi and Carpita, 1991).

۳-۳-۶- هیدرولیز اسیدی ناقص

هیدرولیز اسیدی ناقص پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از روش تانگ^۲ و همکاران (۲۰۰۸) انجام گرفت. به طور خلاصه ۸۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۳ میلی لیتر از محلول ۰/۰۵ مولار اسید تری فلورواستیک در دمای ۸۰°C به مدت ۱۶ ساعت هیدرولیز شد. پلی ساکارید هیدرولیز شده به منظور حذف رسوبات سانتریفیوژ شد و رسوبات جدا شده تحت عنوان پلی ساکارید ۱ نامگذاری شدند. سپس سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد و در انتها فراکشن های جدا شده جمع آوری و تحت عنوان پلی ساکارید ۴ نامگذاری شدند. سیال باقی مانده در کیسه دیالیزی توسط اتانل رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عنوان پلی ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند. تمامی فراکشن ها پس از خشک شدن توسط کروماتوگرافی گازی، همانگونه که قبلاً ذکر شد، آنالیز شدند (Aspinall, 1957; Tong et al., 2008).

^۱ M-Hydroxydiphenyl

^۲ Tong

۳-۳-۷- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت

ابتدا ۲۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲۵ میلی لیتر از محلول ۰/۰۴ مولار پریودات سدیم^۱ اکسید شد و پس از نگهداری در تاریکی، هر ۴ ساعت یک بار میزان جذب آن در ۲۲۳ نانومتر ثبت گردید. پایان اکسیداسیون با ثابت شدن میزان جذب پس از ۹۶ ساعت تعیین شد و پریودات سدیم مازاد با افزودن اتیل گلیکول حذف گردید. مصرف پریودات و تولید اسید فرمیک به ترتیب توسط روش اسپکتروفتومتری و تیتراسیون با محلول ۰/۰۵۳ مولار سود تعیین شد. محلول حاوی محصولات حاصل از پریودات به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد و سپس توسط ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم (در دمای ۲۵ °C و به مدت ۱۲ ساعت) خنثی گردید. درنهایت هیدرولیز کامل توسط محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک، همانطور که قبلاً در بخش آنالیز مونوساکاریدها ذکر شد، صورت گرفت و محصولات حاصله پس از استیله شده توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند (Aspinall and Ferrier, 1957; Chaplin and Kennedy, 1994; Zhao et al., 2005).

۳-۳-۸- متیله کردن

ابتدا ۵ میلی گرم پلی ساکارید کاملاً خشک شده را داخل یک بالن ۲۵ میلی لیتری ته گرد ریخته و با استفاده از سرنگ شیشه‌ای ۱ میلی لیتری DMSO به آن اضافه می کنیم. سپس مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سونیکیت شده و مجدداً با استفاده از سرنگ شیشه‌ای ۰/۴ میلی لیتر محلول متیل سولفینیل متیل سدیم^۲ به آن اضافه می گردد. ژل حاصله به وسیله سونیکیت شدن در دمای ۲۵°C به مدت ۲۰ دقیقه تبدیل به مایع می شود. سپس ۰/۳ میلی لیتر یدید متیل خشک به آن اضافه شده و مجدداً در دمای ۲۵°C به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت می شود. مخلوط حاصله به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شده و سپس مقدار کمی آب برای خنثی کردن متیل سولفینیل متیل سدیم مازاد، به آن

^۱ NaIO₄

^۲ Methylsulfinyl methyl sodium

اضافه می‌گردد. سوسپانسیون حاصل به لوله های سانتریفیوژی ۱۲ میلی‌لیتری منتقل می‌شود و پلی- ساکارید متیله شده موجود در سوسپانسیون توسط ۴ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شده و توسط طیف‌سنج مادون قرمز مورد بررسی قرار می‌گیرد. عدم پیک جذبی در نواحی مربوط به گروه هیدروکسیل (حدود 3420 cm^{-1}) نشانه کامل شدن فرآیند متیله کردن می‌باشد. محصولات متیله شده توسط اسید فرمیک و محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک هیدرولیز شده و پس از حذف اسید مازاد توسط بروهیدرید سدیم خنثی می‌شود. آلدیتول‌های حاصل توسط مخلوط پیریدین- آنیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام آب 90°C به مدت ۱ ساعت استیله شده و به استات‌های آلدیتول مربوطه تبدیل می‌شود و در نهایت استات‌های آلدیتول پاره‌ای متیله شده توسط کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی مورد آنالیز قرار می‌گیرند. کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی مورد استفاده مجهز به ستون موبینه کواتزی HPS (۲۵ متر $\times$ ۰/۲۲ میلی‌متر $\times$ ۰/۲ میکرومتر) بود. دمای ستون در 120°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای 260°C (با نرخ 15°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در همین دما نگهداری شد. باقی مشخصات مشابه با کروماتوگرافی گازی ذکر شده در بخش شناسایی مونوساکاریدها بود (Chaplin and Kennedy, 1994; Needs and Selvendron, 1993).

۳-۳-۹- طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای

طیف‌های NMR کربن-۱۳ و پروتون پلی‌ساکارید توسط طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز برای NMR پروتون و ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز برای NMR کربن-۱۳ در دمای 27°C ثبت شد. استاندارد مورد استفاده DSS و زمان بازداری ۲ ثانیه بود. مقداری از پلی‌ساکارید در حلال بی اثر D_2O (۹۹/۹٪) به صورت محلول در آمد و سپس در بین دو قطب مغناطیس دستگاه قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده در آن به وسیله دستگاه NMR در مقایسه با جسم استاندارد و به صورت یک سری خطوط با پیکهایی با ارتفاع‌های متفاوت ثبت و مورد ارزشیابی قرار گرفت. جابه جایی شیمیایی پیک ها بر حسب ppm نمایش داده شد (Duenas-Chasco et al., 1997).

فصل چہارم

نتائج و بحث

۴-۱- استخراج و خالص سازی پلی ساکارید گون نوک خمیده:

همان‌طور که در فصل مواد و روش‌ها اشاره شد ۱۰۰ گرم ریشه گیاه گون نوک خمیده پس از طی کردن مراحل رنگبری، توسط آب گرم 60°C استخراج و پس از پروتئین زدایی توسط اتانول مطلق رسوب داده شد و حدود $2/0.92$ گرم پلی ساکارید خام بدست آمد. پلی ساکارید خام قهوه‌ای رنگ بود لذا برای انجام مراحل خالص سازی پیشرفته وارد ستون‌های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس ۱۰۰- G شد و پس از شست و شو و خشک کردن در نهایت حدود $0/0.15$ گرم پلی ساکارید خالص از $0/0.91$ گرم پلی ساکارید خام وارد شده به ستون‌ها بدست آمد. پلی ساکارید خالص سفید رنگ بود (شکل ۴-۱) و جهت انجام آزمایشات تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۴-۱: پلی ساکاریدهای حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده خام (راست) و کاملاً خالص (چپ).

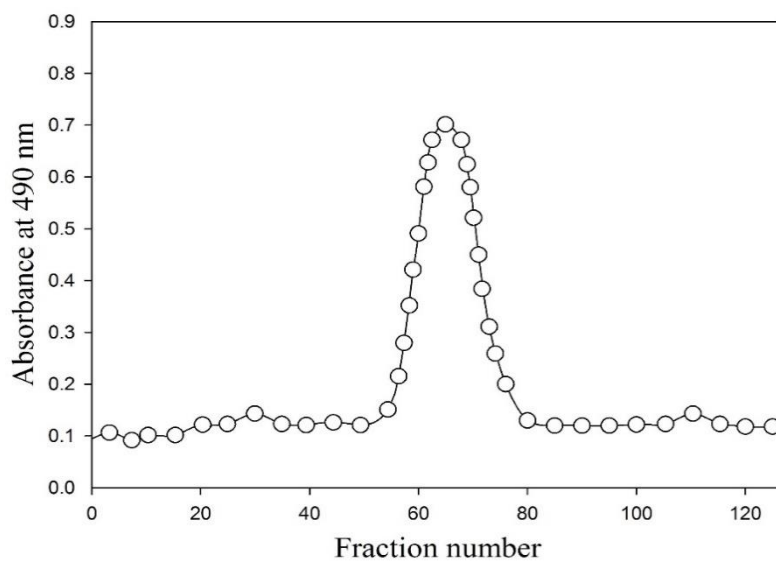
پلی ساکارید خالص به آزمون برادفورد پاسخ منفی داد و فاقد جذب در ناحیه 280 نانومتر از طیف فرابنفش بود که بیانگر عدم حضور پروتئین و اسید نوکلئیک در ترکیب پلی ساکارید خالص است. بعلاوه عدم حضور ترکیبات ذکر شده به معنی حذف کامل این ترکیبات در مراحل جداسازی و کارآمد بودن روش استخراج مورد استفاده است.

۲-۴- تعیین درجه چرخش نوری:

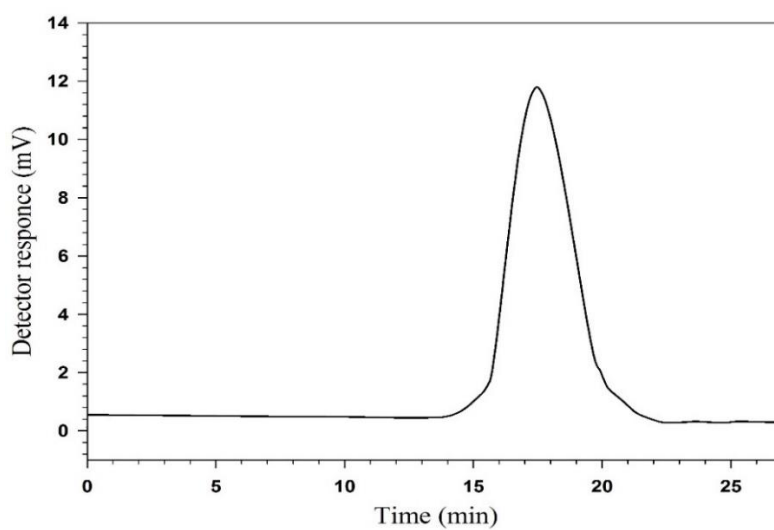
درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده توسط دستگاه پلاریمتر اندازه گیری و مقدار $+181^{\circ}$ در دمای 20°C محاسبه شد. درجه چرخش نوری بالاتر از $+100^{\circ}$ نشان دهنده سهم بیشتر اتصالات آنومری نوع آلفا (α) نسبت به نوع بتا (β) در ساختار واحدهای مونومری ترکیبات قندی است. لذا می توان این طور استنباط کرد که واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده ساختار پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده اکثراً از طریق اتصالات نوع آلفا به یکدیگر متصل شده اند. اگرچه اتصالات نوع بتا نیز ممکن است در ساختار پلی ساکارید موجود باشند ولی مقدار آن ها و سهمشان نسبت به نوع آلفا کمتر است.

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

برای تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص، از ستون سفادکس G-۱۰۰ و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا (HPGPC) به همراه استانداردهای دکستران استفاده شد. مطابق با منحنی حاصل از جمع آوری فراکشن های شسته شده از ستون سفادکس G-۱۰۰، پیک کاملاً غالب و مقارنی مشاهده می شود (شکل ۲-۴) که در نهایت فراکشن های شماره ۵۰ تا ۱۰۰ در یکدیگر ادغام و جهت تعیین وزن مولکولی با دستگاه HPGPC به همراه آشکارساز ضریب شکست نور مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۴-۲: منحنی جذب فراكشن‌های جمع‌آوری شده پس از شست و شوی پلی‌ساکارید خالص با ستون سفادکس ۱۰۰-G.



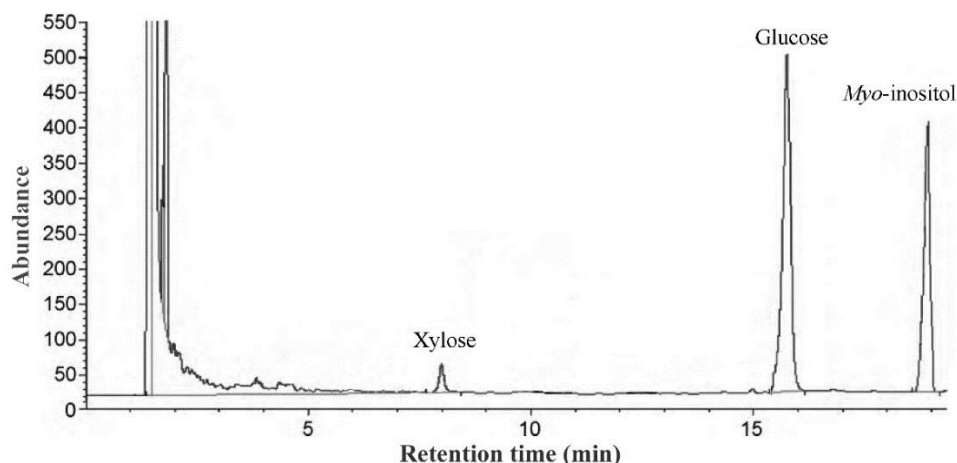
شکل ۴-۳: کروماتوگرام پلی‌ساکارید خالص با استفاده از دستگاه HPGPC.

شکل ۴-۳ منحنی حاصل از آشکارساز ضریب شکست نور پلی‌ساکارید خالص را نشان می‌دهد. با توجه به منحنی پیک متقارن و منحصر به فردی مشاهده می‌شود که نشان دهنده همگن بودن پلی‌ساکارید خالص است. میانگین وزن مولکولی پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده با مقایسه منحنی مربوط به پلی‌ساکارید خالص و منحنی استانداردهای دکستران، محاسبه و مقدار $4/3 \times 10^4$

دالتون (۴۳ کیلو دالتون) محاسبه شد. در طی سال‌های اخیر در میان گونه‌های گون، مطالعات گسترده‌ای تنها بر روی پلی‌ساکارید ریشه گون ممبراناسه صورت گرفته است که دارای وزن مولکولی ۸/۶-۱۶۹۹ کیلو دالتون بودند. در بین مطالعات صورت گرفته توسط محققان، بیش‌ترین وزن مولکولی پلی‌ساکارید ریشه گون ممبراناسه ۱۶۹۹/۱، ۱۵۸۰ و ۱۱۹۷/۶ کیلو دالتون تخمین زده شد که بیشتر از وزن مولکولی پلی‌ساکارید ریشه گون نوک خمیده است. کمترین وزن مولکولی پلی‌ساکارید ریشه گون ممبراناسه ۸/۶۸۰ و ۱۱ کیلو دالتون و همچنین گلوکان‌های جداسازی شده دارای وزن مولکولی ۱۲-۳۶ کیلو دالتون بودند که کمتر از وزن مولکولی پلی‌ساکارید ریشه گون نوک خمیده است (Jin et al., 2014; Shi et al., 2015; Fu et al., 2013; Li et al., 2010; Zhu et al., 2011; Niu et al., 2011; Zhao et al., 2011; Liu et al., 2011; Jiang et al., 2010; Yan et al., 2010; Liu et al., 2010; Jiang et al., 2010; Li et al., 2010; Li and Zhang, 2009; Li et al., 2009; Li et al., 2007; Wang et al., 2006; Shao et al., 2004; Liu et al., 2003).

۴-۴- تعیین قند کل و شناسایی واحدهای مونومری پلی‌ساکارید خالص:

میزان قند کل پلی‌ساکارید خالص پس از محاسبه با روش فنل-اسیدسولفوریک، ۹۸/۹٪ تعیین شد که نشان دهنده درجه خلوص بسیار بالای پلی‌ساکارید استخراج شده از ریشه گیاه گون نوک خمیده است. اندازه گیری مقدار اسیدهای ارونیک پلی‌ساکارید خالص توسط روش رنگ سنجی ام-هیدروکسی دی فنیل در ۵۲۵ نانومتر نشان داد که پلی‌ساکارید خالص فاقد اسیدهای ارونیک بوده و از نوع خنثی است. برای تعیین واحدهای مونومری تشکیل دهنده ساختار، پلی‌ساکارید خالص توسط اسید تری فلورو استیک به واحدهای مونومری سازنده خود هیدرولیز شد و پس از استیله شدن به استات‌های آلدیتول تبدیل گردید. در نهایت استات‌های آلدیتول توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند. نتایج حاصل در شکل ۴-۴ نشان داده شده است. همانطور که در کروماتوگرام گازی مشاهده می‌شود، پلی‌ساکارید خالص از واحدهای مونومری گلوکز و زایلوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱۷/۲ و ۱/۰ تشکیل شده است.

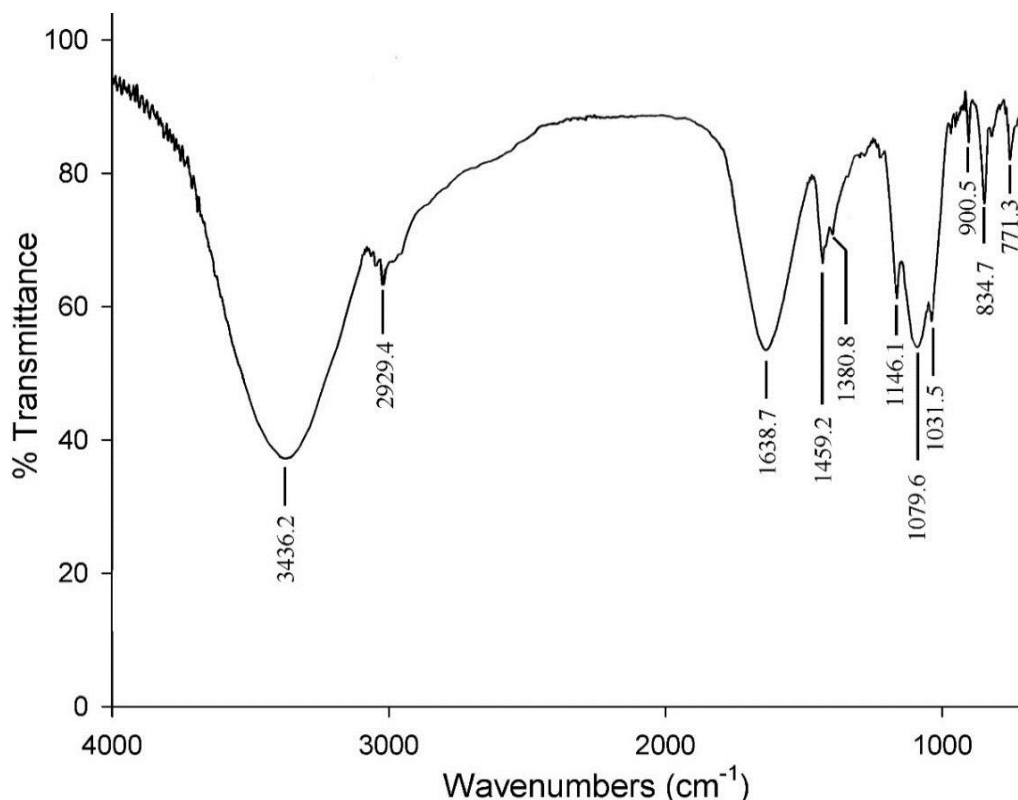


شکل ۴-۴: کروماتوگرام گازی واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده پلی ساکارید خالص.

نتایج حاصل از آنالیز واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده پلی ساکارید خالص نشان می دهد که مونوساکارید گلوکز، مونومر اصلی سازنده پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده است و در ساختار اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص قرار دارد. از این رو پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده یک گلوکان محسوب می شود. با جمع بندی نتایج حاصل از این بخش با نتیجه حاصل از تعیین درجه چرخش نوری می توان بیان کرد که پلی ساکارید خالص از واحدهای گلوکز که اکثراً توسط اتصالات آلفا به یکدیگر متصل شده اند تشکیل شده است. در طی مطالعات انجام گرفته روی پلی ساکارید ریشه گون ممبراناسه گزارش شده است که اغلب هتروپلی ساکاریدها با نسبت های مختلف از ۹ مونوساکارید، گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز، رامنوز، مانوز، زایلوز، فوکوز، فروکتوز و ریبوز تشکیل شده اند و در عین حال در برخی موارد حاوی اسید گلوکورونیک و اسید دی گالاکتورونیک هستند (Jin et al., 2014; Shi et al., 2015; Fu et al., 2013; Li et al., 2010; Zhu et al., 2011; Niu et al., 2011; Zhao et al., 2011; Liu et al., 2011; Jiang et al., 2010; Yan et al., 2010; Liu et al., 2010; Jiang et al., 2010; Li et al., 2010; Li and Zhang, 2009; Li et al., 2009; Li et al., 2007; Wang et al., 2006; Shao et al., 2004; Liu et al., 2003).

۵-۴- طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص:

همانطور که قبلاً اشاره شد از طیف مادون قرمز جهت شناسایی گروه‌های عاملی موجود در ساختار پلی ساکارید خالص استفاده شد. شکل ۵-۴ طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده را نشان می‌دهد.



شکل ۵-۴: طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده.

طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص پیک کشیده بزرگی را در محدوده $3436/2 \text{ cm}^{-1}$ نشان می‌دهد که مربوط به گروه هیدروکسیل است. وجود یک پیک ضعیف در محدوده $2929/4 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده اتصالات C-H کربن شماره ۶ قند است. پیک پهنی در محدوده $1638/7 \text{ cm}^{-1}$ اتصال با آب را نشان می‌دهد. پیک‌های $1459/2 \text{ cm}^{-1}$ و $1380/8 \text{ cm}^{-1}$ ارتعاشات C-H در ساختار حلقه و پیک $1146/1 \text{ cm}^{-1}$ اتصالات اتری C-O (C-O-C) را نشان می‌دهد. اتصالات الکلی C-O (C-O-H) در ناحیه $1079/6 \text{ cm}^{-1}$ و $1031/5 \text{ cm}^{-1}$ نمایان شده است. باند موجود در ناحیه $900/5 \text{ cm}^{-1}$ بیانگر وجود

کنفورماسیون آنومری بتا (β) در ساختار پلی ساکارید خالص است. بعلاوه باند موجود در ناحیه cm^{-1} ۸۳۴/۷ و cm^{-1} ۷۷۱/۳ به ترتیب نشان دهنده وجود کنفورماسیون آنومری آلفا (α) و وجود حلقه‌های پیرانوزی در ساختار پلی ساکارید خالص است (Zhu et al., 2011). با جمع بندی اطلاعات ذکر شده از طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص می‌توان عنوان کرد پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده از واحدهای مونوساکاریدی با اشکال پیرانوزی به همراه هر دو نوع اتصالات آنومری آلفا و بتا تشکیل شده است.

۴-۶- هیدرولیز ناقص اسیدی:

مطابق آنچه در بخش مواد و روش‌ها (۳-۳-۳-۶) بیان شد، پس از انجام هیدرولیز ناقص اسیدی، چهار فراکشن پلی ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)، پلی ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)، پلی ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز) و پلی ساکارید ۴ (فراکشن بیرون از کیسه دیالیز) از پلی ساکارید خالص بازیافت و پس از هیدرولیز کامل با اسید تری فلورو استیک توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی نشان داد که در پلی ساکارید ۱ و ۲ تنها گلوکز وجود دارد (جدول ۴-۱) لذا می‌توان استنباط کرد که گلوکز واحد مونومری سازنده اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص است. حضور زایلوز در پلی ساکارید ۳ و ۴ نشان داد که واحدهای مونومری زایلوز سازنده اجزای مونوساکاریدی شاخه‌های جانبی پلی ساکارید خالص هستند. این نتایج با نتایج حاصل از آنالیز واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص همخوانی داشت.

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

نسبت‌های مولی	فراکشن‌ها	
زایلوز	گلوکز	
_____	+	پلی ساکارید ۱
_____	+	پلی ساکارید ۲
+	_____	پلی ساکارید ۳
+	_____	پلی ساکارید ۴

۴-۷- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت:

در نتیجه اکسیداسیون پریودات ۱/۰۷ مول پریودات مصرف و در حدود ۰/۰۶ مول اسید فرمیک تولید شد. مقدار مصرف پریودات بیش از ۲ برابر تولید اسید فرمیک بود که نشان دهنده سهم کم اتصالات نوع ۱→۶ و ۱→۴ در ساختار پلی ساکارید خالص است و بیان می‌کند که اتصالات دیگری مانند ۱→۴ و ۱→۲ در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارد که اسید فرمیک تولید نمی‌کنند. با توجه به زیاد بودن مصرف پریودات به ازای هر مول واحد قندی می‌توان نتیجه گرفت که اتصال نوع ۱→۳ و ۶ و ۳ و ۱→۱ در ساختار پلی ساکارید خالص وجود ندارد یا میزان آن‌ها بسیار کم است. از جمع بندی نتایج مربوط به این بخش می‌توان عنوان کرد که در حدود ۶٪ از اتصالات موجود در ساختار پلی ساکارید خالص از نوع ۱→۶ و ۱→۱ است و ۹۴٪ باقیمانده را سایر اتصالات تشکیل می‌دهند که سهم اتصالات نوع ۱→۴ و ۱→۲ در آن‌ها بسیار بالا است. آنالیز کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات کاملاً هیدرولیز شده بیانگر عدم حضور گلوکز و زایلوز بود (جدول ۴-۲). عدم حضور دو واحد مونومری ذکر شده بیانگر این واقعیت است که تمام واحدهای مونومری گلوکز و زایلوز در ساختار پلی ساکارید خالص دارای اتصالاتی مانند ۱→۶، ۱→۲، ۱→۴، ۶ و ۱→۲ و ۶ و ۱→۴ هستند که توسط پریودات بطور کامل اکسید می‌شوند. اریتریتول و گلیسرول در محصولات حاصل از پریودات مشاهده شد که وجود سهم بالای اریتریتول نسبت به گلیسرول بیانگر وجود سهم بالای اتصالات نوع ۱→۴ و ۶ و ۱→۴ در ساختار پلی ساکارید خالص بود. عدم مشاهده رسوب در کیسه دیالیزی نشان

می‌دهد که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص کاملاً توسط پریودات اکسید شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده دارای اتصالاتی مانند $1 \rightarrow 2$ ، $1 \rightarrow 4$ ، $6 \rightarrow 2$ و $6 \rightarrow 4$ و $6 \rightarrow 4$ (با سهم بسیار بالای $1 \rightarrow 4$ و $6 \rightarrow 4$) است که تماماً توسط پریودات اکسید می‌شوند.

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

فراکشن‌ها	نسبت‌های مولی			
	گلیسرول	اریتریتول	گلوکز	زایلوز
محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات				
هیدرولیز کامل اسیدی	۰/۹۶	۱۷/۹۳	_____	_____
تجزیه اسمیت				
بیرون از کیسه دیالیز	۱/۰۳	۱۸/۰۴	_____	_____
روی کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____
رسوب در کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____

۴-۸- متیله کردن:

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی حضور ۳ پیک متفاوت را نشان داد (جدول ۴-۳). این پیک‌ها پس از شناسایی با طیف سنج جرمی عبارت بودند از ۲ و ۳ و ۶- تری متیل گلوکز، ۲ و ۳- دی متیل گلوکز و ۲ و ۳ و ۴- تری متیل زایلوز که به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱۵/۸۳، ۱/۰۲، ۰/۹۸ (حدود ۱:۱۶:۱) در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود داشتند. نسبت‌های مولی حاصل از آزمون متیله کردن با نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی‌ساکارید خالص مطابقت داشت. بعلاوه نتایج حاصل سازگاری خوبی با نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت داشت. نسبت مولی گلوکز با اتصال ۶ و $1 \rightarrow 4$ (محل نقطه انشعاب) با نسبت مولی زایلوز با اتصال $1 \rightarrow 2$ تقریباً مشابه بود لذا می‌توان استنباط کرد که شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید

خالص تماماً توسط واحدهای مونومری زایلوز به انتها می‌رسد. میزان درصد انشعابات با توجه به جدول ۳-۴ در حدود ۶٪ محاسبه شد. عدم مشاهده گروه متیل بر روی کربن شماره ۵ تمام واحدهای مونومری بیانگر حضور حلقه پیرانوز در ساختار تمام واحدهای مونومری سازنده پلی‌ساکارید خالص است.

جدول ۳-۴: نتایج کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی پلی‌ساکارید خالص متیله شده.

نوع اتصال	فراگمت‌های جرمی (m/z)	نسبت مولی	قند متیله شده
$\rightarrow 4\text{-Glc}p\text{-(1}\rightarrow$	۴۳, ۴۵, ۵۹, ۸۷, ۹۹, ۱۰۲, ۱۱۳, ۱۱۸, ۱۲۹, ۱۶۲, ۲۳۳	۱۵/۸۳	2,3,6-Me ₃ -Glc
$\rightarrow 4,6\text{-Glc}p\text{-(1}\rightarrow$	۴۳, ۸۵, ۱۰۲, ۱۱۸, ۱۲۷, ۱۶۲, ۲۰۱, ۲۶۱	۱/۰۲	2,3-Me ₂ -Glc
Xylp-(1 $\rightarrow$	۴۳, ۸۸, ۱۰۲, ۱۱۷, ۱۶۱	۰/۹۸	2,3,4-Me ₃ -Xyl

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

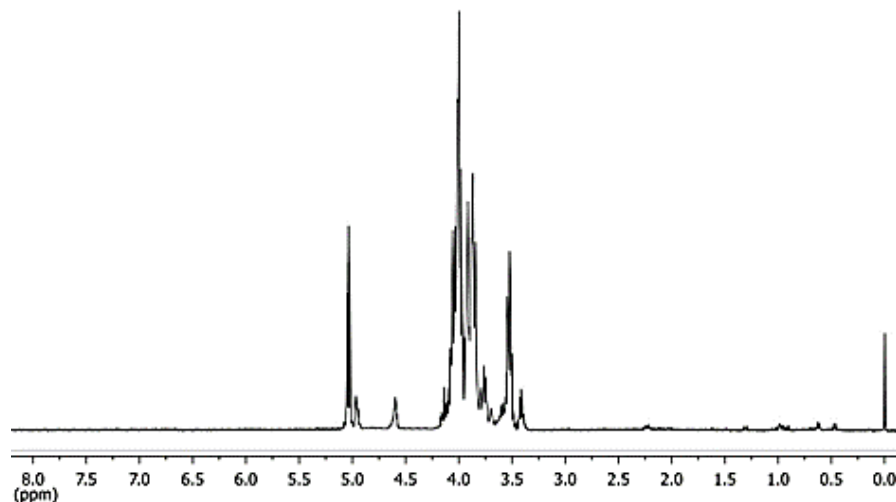
الف) طیف NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص:

با توجه به شکل ۴-۶ وجود سیگنال در نواحی (۵/۰۳ و ۴/۹۷) و ۴/۶۲ ppm به ترتیب نشان دهنده پروتون‌های آنومری $\alpha\text{-D-Glc}p$ و $\beta\text{-D-Xyl}p$ است. سیگنال‌های مربوط به پروتون‌های متصل به سایر کربن‌ها در جدول ۴-۴ آمده است.

جدول ۴-۴: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR پروتون پلی‌ساکارید خالص.

واحدهای قندی	δ (ppm)، جابه‌جایی شیمیایی					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-(1}\rightarrow$	۵/۰۳	۳/۸۱	۳/۹۰	۳/۵۹	۴/۰۱	۳/۹۶
$\rightarrow 4,6\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-(1}\rightarrow$	۴/۹۷	۳/۷۸	۳/۹۹	۳/۵۲	۳/۷۳	۴/۱۱
$\beta\text{-D-Xyl}p\text{-(1}\rightarrow$	۴/۶۲	۳/۳۹	۳/۴۷	۳/۶۳	۳/۸۲	_____

نتایج حاصل از طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده مبنی بر وجود اشکال آنومری آلفا-گلوکز و بتا-زایلوز به صورت حلقه‌های پیرانوزی با نتایج حاصل از تعیین درجه چرخش نوری و طیف مادون قرمز سازگاری داشت.

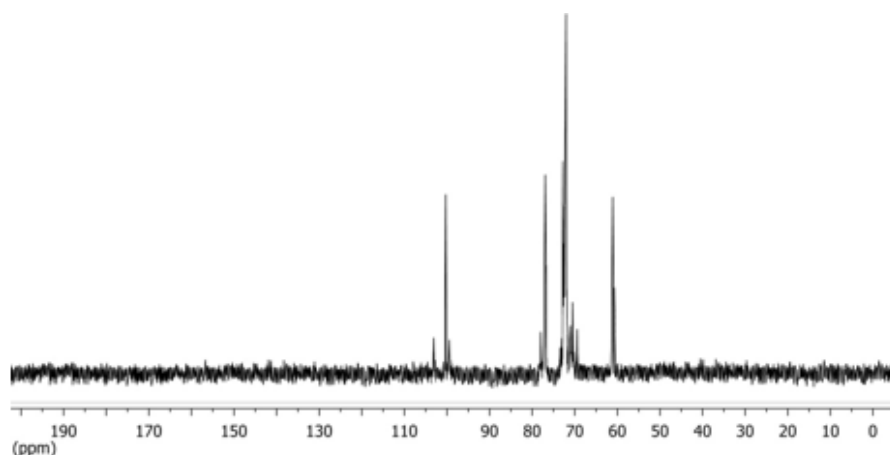


شکل ۴-۶: طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص.

ب- طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص:

شکل ۴-۷ سیگنال‌های مربوط به کربن‌های پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده را نشان می‌دهد. وجود سیگنال در نواحی ۱۰۰/۲ و ۹۹/۸ ppm بیانگر کربن‌های آنومری آلفا-D-گلوکوپیرانوز است. سیگنال در ناحیه ۱۰۰/۴ ppm کربن آنومری بتا-D-زایلوپیرانوز را نشان می‌دهد. علت شناسایی نوع آنومری آلفا و بتا در واحدهای مونومری نامبرده این است که سیگنال‌های کربن آنومری آلفا معمولاً در محدوده ۱۰۰-۱۰۱ ppm و نوع بتا در بالاتر از ۱۰۳ ppm ظاهر می‌شود (Fu et al., 2013). عدم مشاهده سیگنال کربن شماره ۱ واحدهای مونومری در محدوده ۱۱۰-۱۰۵ ppm بیانگر این واقعیت است که تمام واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص دارای اشکال حلقه‌های پیرانوزی هستند. وجود سیگنال در نواحی ۷۷ و ۶۹ ppm به ترتیب کربن‌های شماره ۴ و ۶ گلوکز را نشان می‌دهد که در تشکیل اتصال شرکت کرده اند. سیگنال‌های مربوط به سایر کربن‌های واحدهای

قندی در جدول ۴-۵ آمده است. نتایج حاصل از طیف NMR پروتون و کربن پلی ساکارید خالص با نتایج حاصل از آزمون‌های متیله کردن، طیف مادون قرمز، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت سازگاری داشت.

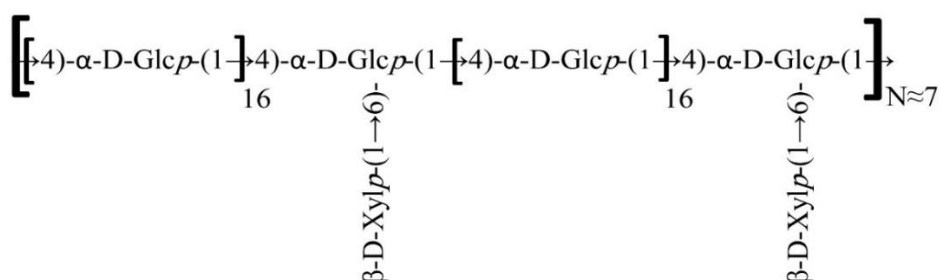


شکل ۴-۷: طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص.

جدول ۴-۵: مقادیر جابه‌جایی شیمیایی NMR کربن پلی ساکارید خالص.

واحدهای قندی	δ (ppm)، جابه‌جایی شیمیایی					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow$	۱۰۰/۲	۷۲/۶	۷۳/۴	۷۷/۰	۷۱/۳	۶۱/۹
$\rightarrow 4,6)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow$	۹۹/۸	۷۲/۵	۷۳/۲	۷۷/۴	۷۰/۸	۶۸/۸
$\beta\text{-D-Xylp}-(1\rightarrow$	۱۰۳/۴	۷۳/۷	۷۷/۰	۷۰/۱	۶۹/۷	_____

با جمع بندی نتایج حاصل از تمام آنالیزهای ذکر شده، ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده به شرح شکل ۴-۸ است.



شکل ۴-۸: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده.

در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای بر روی گونه گون ممبراناسه صورت گرفته و محققان دریافتند که پلی ساکاریدهای جدا شده به صورت گلوکان با ساختار آلفا (۱→۴) گلوکز در زنجیر اصلی و آلفا (۱→۶) در انشعابات تشکیل شده است. همچنین هتروپلی ساکاریدهایی نیز با ساختار بتا (۱→۳) در زنجیر اصلی دیده می‌شود. در بین گونه‌های گون شناسایی شده نیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ ساختار پلی ساکارید گون ممبراناسه واریته مغولستانی را ترسیم کردند که در فصل بررسی منابع در شکل ۲-۲ آمده است. آن‌ها دریافتند که پلی ساکارید موجود تنها از واحدهای آلفا D گلوکز تشکیل شده است در حالی که پلی ساکارید گون نوک خمیده از واحدهای مونوساکاریدی آلفا D گلوکز و بتا D زایلوز تشکیل شده است. پلی ساکارید گون ممبراناسه از واحدهای ۱→۴ در زنجیر اصلی و ۱→۶ در شاخه‌ها به ازای هر ۱۰ واحد گلوکز در زنجیر اصلی تشکیل شده است در صورتی که پلی ساکارید گون نوک خمیده از واحدهای گلوکز ۱→۴ در زنجیر اصلی و ۱→۶ زایلوز در شاخه‌ها به ازای هر ۱۷ واحد گلوکز تشکیل شده است.

نتیجه گیری کلی:

در این بررسی پلی ساکارید خام حاصل از ریشه گیاه گون نوک خمیده توسط استخراج با آب، پروتئین زدایی و ترسیب با اتانول جداسازی شد. خالص سازی پلی ساکارید خام توسط ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفادکس G-۱۰۰ انجام گرفت. پلی ساکارید کاملاً خالص بدست آمده به رنگ سفید بود. آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید خالص نشان داد که واحدهای مونومری گلوکز و زایلوز مونومرهای سازنده پلی ساکارید خالص بودند که سهم گلوکز ۱۷ برابر زایلوز بود. ساختار پلی ساکارید خالص بوسیله ترکیبی از روش ها مانند درجه چرخش نوری، طیف سنج مادون قرمز، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریدوات، تجزیه اسمیت، همچنین متیله کردن و طیف رزونانس مغناطیس هسته بررسی شد. نتایج نشان داد که گلوکز مونومر اصلی سازنده پلی ساکارید خالص است و ساختار اصلی زنجیر بصورت آلفا-D-گلوکوپیرانوز است و زایلوز بصورت انشعابات بتا-D-زایلوپیرانوز به ازای هر ۱۷ واحد گلوکز در زنجیر اصلی وجود دارد. از آنجایی که در ساختار پلی ساکارید ریشه گون ممبراناسه در برخی موارد گلوکان دیده می شود، ساختار پیشنهاد شده پلی ساکارید ریشه گون ممبراناسه تا حدی مشابه با پلی ساکارید گون نوک خمیده است. بر طبق مطالعات انجام گرفته توسط محققان در سال های اخیر ترکیب مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید به طور قابل ملاحظه ای در فعالیت بیولوژیک پلی ساکارید مؤثر است و پلی ساکاریدهایی که از گیاهان متفاوت استخراج شده اند یا نوع یکسانی از گیاه اما در مناطق متفاوت، ترکیبات مونوساکارید متفاوتی دارند. بنابراین می توان تفاوت ساختاری در یک گونه و گونه های متفاوت از گون را توجیه کرد.

منابع مورد استفاده

۱. سلاجقه، ع، (مترجم). اسگوک د. ای، هالز ج، نیمن ت. ای، (نویسنده). (۱۳۸۹). "اصول تجزیه دستگاهی" جلد دوم، چاپ پنجم، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

۲. معصومی ع. ا، (۱۳۸۵) "گون‌های ایران" جلد پنجم، چاپ اول، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران.

۳. معصومی ع. ا، (۱۳۷۹) "گون‌های ایران" جلد چهارم، چاپ اول، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران.

۴. میر محمد صادقی، م، سعیدی، م و هروی، م، (ترجمه). ولهارد ک. پ، شور ن. ای، (۱۳۹۲) "شیمی آلی ساختار و کاربرد" جلد اول، میر محمد صادقی، م، سعیدی م و هروی م، چاپ سوم، انتشارات نورپردازان تهران.

۵. میر محمد صادقی، م، سعیدی، م و هروی، م، (ترجمه). ولهارد ک. پ، شور ن. ای، (۱۳۹۲) "شیمی آلی ساختار و کاربرد" جلد دوم، میر محمد صادقی، م، سعیدی م و هروی م، چاپ سوم، انتشارات نورپردازان تهران.

6. Andersson, R., Westerlund, E. and Aman, P. (2006). Cell wall polysaccharides: Structural, Chemical, and Analytical Aspects. PP 129-176. **Carbohydrates in food**. 2nd. Ed. Elisson, A. C. CRC press. U. S.
7. Aspinall, G. O., and Ferrier, R. J. (1957). A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates. **Chemistry and Industry**, (36), 1216-1216.
8. Bemiller, J. N. and Whistler, R L. (1996). Carbohydrates. PP 158-223. **Food Chemistry**. 3rd. Ed. Fennema, O. R., and Tannenbaum, S. R. Marcel Dekker. New York.
9. Biliaderis, C. G. and Izydorczyk, M. S. (2006). **Functional food carbohydrates**. CRC Press. U. S.
10. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254.
11. Brummer, Y. and Cui, S. W. (2006). Detection and determination of polysaccharides in food. PP 675-690. **Food polysaccharides and their**

Application. 2nd. Ed. Stephen, A. M., Phillips, G. O. and Williams, P. A. CRC Press. New York.

12. Chen, Jin, J., Tang, J., Wang, Z., Wang, Z., Wang, J., L., and Lu, J. (2011). Extraction purification characterization and hypoglycemic activity of polysaccharide isolated from the root of *Ophiopogon japonicas*. **Carbohydrate polymer**, 83(2), 749-754.
13. Cheng, Y., Tang, K., Wu, S., Liu, L., Qiang, C., Lin, X., and Liu, B. (2011). Astragalus polysaccharides lowers plasma cholesterol through mechanisms distinct from statins. **PloS one**, 6(11), pp.1-9.
14. Cui, S. W. (2005). **Food carbohydrates**: chemistry, physical properties, and applications. CRC Press. U. S.
15. Du, M., Wu, X. J., Ding, J., Hu, Z. B., White, K. N. and Branford-White, C. J. (2003). Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of *Astragalus membranaceus* in bioreactors. **Biotechnology letters**, 25(21), pp.1853-1856.
16. Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Mateo, P. T., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J., Irastorza-Iribas, A. and Gil-Serrano, A. M. (1997). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. **Carbohydrate Research**, 303(4), pp.453-458.
17. Filisetti-Cozzi, T. M., and Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical biochemistry**, 197(1), 157-162.
18. Folkes, D. J. and Jordan, M. A. (2006). Mono and Disaccharides: Analytical Aspects. PP 40. “**Carbohydrates in food**”. 2nd. Ed. Elisson, A. C. CRC press. U. S.
19. Fu, J., Huang, L., Zhang, H., Yang, S. and Chen, S. (2013). Structural features of a polysaccharide from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao. **Journal of Asian natural products research**, 15(6), pp.687-692.
20. Gerwig, G. J., Kamerling, J. P. and Vliegthart, J. F., (1978). “Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary GLC”. **Carbohydrate Research**, 62(2), pp.349-357.
21. Ghahremaninejad, F. (2005). Two new records of *Astragalus* species of the sections *Anthylloidei* DC. and *Dissitiflori* DC. from Iran. **Turkish Journal of Botany**, 29(5), pp.399-402.

22. Ghahremaninejad, F. (2004a). The sections of Astragalus L. with bifurcating hairs in Iran. **Turkish Journal of Botany**, 28(1-2), pp.101-117.
23. Ghahremaninejad, F. (2004b). Value of trichome characteristics for the separation of bifurcating hairy Astragalus L.(Fabaceae) at the sectional level. **Turkish Journal of Botany**, 28(1-2), pp.241-245.
24. He, X., Shu, J., Xu, L., Lu, C., and Lu, A. (2012). Inhibitory effect of Astragalus polysaccharides on lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production in THP-1 cells. **Molecules**, 17(3), 3155-3164.
25. Heinze, T., Schwikal, K. and Barthel, S., (2005). Ionic liquids as reaction medium in cellulose functionalization. **Macromolecular Bioscience**, 5(6), pp.520-525.
26. Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. **Micron**, 33(2), 179-197.
27. Jiang, J., Wu, C., Gao, H., Song, J. and Li, H. (2010). Effects of astragalus polysaccharides on immunologic function of erythrocyte in chickens infected with infectious bursa disease virus. **Vaccine**, 28(34), pp.5614-5616.
28. Jiang, J. B., Qiu, J. D., Yang, L. H., HE, J. P., Smith, G. W. and LI, H. Q., (2010). Therapeutic effects of astragalus polysaccharides on inflammation and synovial apoptosis in rats with **adjuvant-induced arthritis**. **International Journal of Rheumatic Diseases**, 13(4), pp.396-405.
29. Jin, M., Zhao, K., Huang, Q. and Shang, P. (2014). “Structural features and biological activities of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus*”. **International journal of biological macromolecules**, 64, pp.257-266.
30. Juan, Y. C., Kuo, Y. H., Chang, C. C., Zhang, L. J., Lin, Y. Y., Hsu, C. Y., and Liu, H. K. (2011). Administration of a decoction of sucrose-and polysaccharide-rich *radix astragali* (*huang qi*) ameliorated insulin resistance and Fatty liver but affected Beta-cell function in type 2 diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
31. Lapasin, R. and Prich, S. (1995). **Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications**. 1st. Ed, Springer, US, pp. 250-494.
32. Li, C. L., Shi, X. L., Men, Y., Yang, L. and Yang, A.M. (2014). August. Purification of Astragalus Polysaccharide with Macroporous Resins. In **Applied Mechanics and Materials** (Vol. 618, pp. 326-329). Trans Tech Publications.

33. Li, R., Chen, W. C., Wang, W. P., Tian, W. Y. and Zhang, X. G. (2010). Antioxidant activity of Astragalus polysaccharides and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA. **Carbohydrate polymers**, 82(2), pp.240-244.
34. Li, R., Chen, W. C., Wang, W. P., Tian, W. Y. and Zhang, X. G. (2009). Extraction, characterization of Astragalus polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. **Carbohydrate Polymers**, 78(4), pp.738-742.
35. Li, S., Zhang, Y. and Zhao, J. (2007). Preparation and suppressive effect of astragalus polysaccharide in glomerulonephritis rats. **International immunopharmacology**, 7(1), pp.23-28.
36. Li, S. G. and Zhang, Y. Q., (2009). Characterization and renal protective effect of a polysaccharide from *Astragalus membranaceus*. **Carbohydrate Polymers**, 78(2), pp.343-348.
37. Li, X. T., Zhang, Y. K., Kuang, H. X., Jin, F. X., Liu, D. W., Gao, M. B. and Xin, X. J. (2012). "Mitochondrial protection and anti-aging activity of Astragalus polysaccharides and their potential mechanism. **International journal of molecular sciences**, 13(2), 1747-1761.
38. Liu, G. G., Borjihan, G., Baigude, H., Nakashima, H. and Uryu, T. (2003). Synthesis and anti-HIV activity of sulfated astragalus polysaccharide. **Polymers for advanced technologies**, 14(7), pp.471-476.
39. Liu, M., Wu, K., Mao, X., Wu, Y. and Ouyang, J. (2010). Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle. **Journal of ethnopharmacology**, 127(1), pp.32-37.
40. Liu, Q.Y., Yao, Y.M., Yu, Y., Dong, N. and Sheng, Z.Y. (2011). Astragalus polysaccharides attenuate postburn sepsis via inhibiting negative immunoregulation of CD4⁺ CD25^{high} T cells. **PLoS One**, 6(6), pp.1-9.
41. Liu, Y., Liu, F., Yang, Y., Li, D., Lv, J., Ou, Y., Sun, F., Chen, J., Shi, Y. and Xia, P. (2014). Astragalus polysaccharide ameliorates ionizing radiation-induced oxidative stress in mice. **International journal of biological macromolecules**, 68, pp.209-214.
42. Lock, J. M. and Simpson, K. (1991). Legumes of west Asia. **Royal Botanic Gardens**, Kew 43-85.

43. Maassoumi, A. A. (1998). *Astragalus* in the Old World: check-list. Research Institute of Forests and Rangelands.
44. Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. **Pharmacognosy Reviews**, 1(1), pp.7-18.
45. Meseguer, I., Aguilar, V., González, M. J., and Martínez, C. (1998). Extraction and colorimetric quantification of uronic acids of the pectic fraction in fruit and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, 11(4), 285-291.
46. Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T., Tanaka, M., and Miyaji, H. (1981). Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1→3)- β -D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1→3)-glycosidic linkages. **Carbohydrate Research**, 92(1), 115-129.
47. Mohammadifar, M. A., Musavi, S. M., Kiumarsi, A. and Williams, P. A. (2006). Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus*). **International Journal of Biological Macromolecules**, 38(1), pp.31-39.
48. Muralikrishna, G. and Subba Rao, M.V.S.S.T. (2007). Cereal non-cellulosic polysaccharides: structure and function relationship—an overview. **Critical reviews in food science and nutrition**, 47(6), pp.599-610.
49. Murray, R. K. (2009). **Harper's illustrated biochemistry**. 28th, Ed, McGraw-Hill Medical, New York, pp 704.
50. Needs, P. W. and Selvendran, R. R. (1993). Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. **Carbohydrate Research**, 245(1), pp.1-10.
51. Nielsen, S.S. (2010). “**Food analysis**”. (p. 550). New York, NY, USA: Springer.
52. Niu, Y., Wang, H., Xie, Z., Whent, M., Gao, X., Zhang, X., Zou, S., Yao, W. and Yu, L. (2011). Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. **Food Chemistry**, 128(3), pp.620-626.
53. Olennikov, D. N. and Rokhin, A. V. (2010). Fabaceae Polysaccharides. III. Galactomannan from *Astragalus cicer* seeds. **Chemistry of natural compounds**, 46(2), pp.165-168.

54. Olennikov, D. N. and Rokhin, A. V. (2009). Polysaccharides of Fabaceae. II. Galactomannan from *Astragalus danicus* seeds. **Chemistry of natural compounds**, 45(3), pp.297-299.
55. Olennikov, D. N. and Rokhin, A. V. (2008). Polysaccharides of Fabaceae. I. Galactomannan of *Astragalus sericeocanus* seeds. **Chemistry of natural compounds**, 44(6), pp.685-687.
56. Osaloo, S. K., Maassoumi, A. A., and Murakami, N. (2003). Molecular systematics of the genus *Astragalus* L.(Fabaceae): phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences. **Plant Systematics and Evolution**, 242(1-4), 1-32.
57. Pazur, J. H. (1994). Neutral polysaccharides. PP 73-122. **Carbohydrate Analysis. A Practical Approach**. 2nd. Ed. Chaplin, M. F., and Kennedy, J. F. IRL Press. New York.
58. Ranjbar, M., and Karamian, R. (2003). Some remarks on the genus *Astragalus* sect. *Incarni* in Iran". **Botanical Journal of the Linnean Society**, 143(4), 443-447.
59. Ray, B. (2006). Polysaccharide from *Enteromorpha* : Isolation and purification and structural features. **Carbohydrate Polymer**, 66(3), 408-416.
60. Rees, D. A. (1977). **More complex carbohydrate chains. In Polysaccharide Shapes** (pp. 62-73). Springer, Netherlands.
61. Sanderson, M. J., and Wojciechowski, M. F. (1996). Diversification rates in a temperate legume clade: are there so many species" of *Astragalus* (Fabaceae)". **American Journal of Botany**, 1488-1502.
62. Shao, B. M., Xu, W., Dai, H., Tu, P., Li, Z. and Gao, X. M. (2004). A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. **Biochemical and biophysical research communications**, 320(4), pp.1103-1111.
63. Shi, H., Yu, F. and Wang, Q. (2015). *Astragalus membranaceus* Polysaccharide-Enhanced Lymphocytes Proliferation of Yellow Drum Nibea albiflora In Vitro. In **Advances in Applied Biotechnology** (pp. 249-254). Springer Berlin Heidelberg.

64. Sun, L., Feng, K., Jiang, R., Chen, J., Zhao, Y., Ma, R. and Tong, H. (2010). Water-soluble polysaccharide from *Bupleurum chinense* DC: Isolation, structural features and antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, 79(1), pp.180-183.
65. Tong, H., Liang, Z. and Wang, G. (2008). Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. **Carbohydrate Polymers**, 71(2), 316-323.
66. Ulvskov, P. (2010). **Annual Plant Reviews, Plant Polysaccharides: Biosynthesis and Bioengineering** (Vol. 41). John Wiley and Sons.
67. Venugopal, V. (2011). **Marine polysaccharides: Food applications**. CRC Press, U. S. pp. 372
68. Viel, S., Capitani, D., Mannina, L. and Segre, A., (2003). "Diffusion-ordered NMR spectroscopy: a versatile tool for the molecular weight determination of uncharged polysaccharides". **Biomacromolecules**, 4(6), pp.1843-1847.
69. Wang, J., Ito, H., and Shimura, K. (1989). Enhancing effect of antitumor polysaccharide from *Astragalus* or *Radix hedysarum* on C3 cleavage production of macrophages in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**, 51(3), 432-434.
70. Wang, S. C., Shan, J. J., Wang, Z. T. and Hu, Z. B. (2006). Isolation and structural analysis of an acidic polysaccharide from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge. **Journal of Integrative Plant Biology**, 48(11), pp.1379-1384.
71. Wang, Y. F., Yang, X. F., Cheng, B., Mei, C. L., Li, Q. X., Xiao, H., and Liu, K. (2010). Protective effect of *Astragalus* polysaccharides on ATP binding cassette transporter A1 in THP-1 derived foam cells exposed to tumor necrosis factor- α . **Phytotherapy Research**, 24(3), 393-398.
72. Wen, C. F., Dong, A. W., and Li, G. Z. (2005) Determination of total sugar and reducing sugar in *Viola philippica* sp. **Mod Food Sci Technol**, 21(3):122–123.
73. Wojciechowski, M. F., Sanderson, M. J. and Hu, J. M. (1999). Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL intron data. **Systematic Botany**, pp.409-437.
74. Wrolstad, R. E. (2012). **Food carbohydrate chemistry**. (Vol. 48). John Wiley and Sons.

75. Wu, Y., WU, K., and Wang, Y. (2005). Hypoglycemic effect of Astragalus polysaccharide and its effect on PTP1B1. **Acta Pharmacologica Sinica**, 26(3), 345-352.
76. Xu, D. J., Xia, Q., Wang, J. J. and Wang, P. P., 2008. Molecular weight and monosaccharide composition of Astragalus polysaccharides. **Molecules**, 13(10), pp. 2408-2415.
77. Yan, H., Xie, Y., Sun, S., Sun, X., Ren, F., Shi, Q., Wang, S., Zhang, W., Li, X. and Zhang, J. (2010). Chemical analysis of *Astragalus mongholicus* polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 82(3), pp.636-640.
78. Yang, M., Qian, X. H., Zhao, D. H., and Fu, S. Z. (2010). Effects of Astragalus polysaccharide on the erythroid lineage and microarray analysis in K562 cells. **Journal of ethnopharmacology**, 127(2), 242-250.
79. Yu, D., Ma, L., Zhao, J., Liu, T., and Zhang, L. (2009). Quantitative determination of uronic acid in polysaccharides from *Vitis vinifera* L.[J]. **Journal of Xinjiang Medical University**, 5, 006.
80. Zhang, H., Pan, N., Xiong, S., Zou, S., Li, H., Xiao, L., and Huang, Z. (2012). Inhibition of polyglutamine-mediated proteotoxicity by Astragalus membranaceus polysaccharide through the DAF-16/FOXO transcription factor in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Journal**, 441(1), 417-424.
81. Zhang, Y. W., Wu, C. Y., and Cheng, J. T. (2007). Merit of Astragalus polysaccharide in the improvement of early diabetic nephropathy with an effect on mRNA expressions of NF- κ B and I κ B in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats". **Journal of Ethnopharmacology**, 114(3), 387-392.
82. Zhao, G., Kan, J., Li, Z. and Chen, Z. (2005). Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots. **Carbohydrate Polymers**, 61(2), pp.125-131.
83. Zhao, L. H., Ma, Z. X., Zhu, J., Yu, X. H. and Weng, D. P. (2011). Characterization of polysaccharide from *Astragalus radix* as the macrophage stimulator. **Cellular immunology**, 271(2), pp.329-334.
84. Zhu, Z. Y., Liu, R. Q., Si, C.L., Zhou, F., Wang, Y. X., Ding, L. N., Jing, C., Liu, A. J. and Zhang, Y. M. (2011). Structural analysis and anti-tumor activity

comparison of polysaccharides from Astragalus. **Carbohydrate Polymers**, 85(4), pp.895-902.

85. Zhuge, Z. Y., Zhu, Y. H., Liu, P. Q., Yan, X. D., Yue, Y., Weng, X. G., and Wang, J. F. (2012). Effects of Astragalus polysaccharide on immune responses of porcine PBMC stimulated with PRRSV or CSFV. **PloS one**, 7(1), pp.1-7.

Abstract

A new water-soluble polysaccharide with molecular weight of 43 kDa and a specific optical rotation of $+181^\circ$ was extracted from the roots of *Astragalus Curvirostris* by warm water method (60°C). Purification of the polysaccharide was carried out by DEAE-cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. The total sugar of purified polysaccharide was 98.9 % and negligible content of protein and polysaccharide were observed in it. Monosaccharides analysis revealed that the purified polysaccharide of *A. Curvirostris* roots was composed of Glucose and Xylose with a relative molar ratio of 17.2:1.0. *Structure identification of polysaccharide* were elucidated by a combination of methylation, partial acid hydrolysis, GC-MS analysis, periodate oxidation and Smith degradation, FT-IR and NMR spectroscopy. The data obtained indicate that main chain consisted of (1 $\rightarrow$ 4)-linked α -D-glucopyranosyl residues, with branches at O-6 it is structure consist of non-reducing terminal β -D-Xylopyranose approximately every 17 residues.

Keywords: Polysaccharides, Extraction and Purification, Structure determination, *Astragalus Curvirostris*.



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Food Industry

Structural study of a main water-soluble polysaccharide from
Astragalus Curvirostris roots

By: Arezu Zoghi

Supervisor:
Dr Kambiz Jahanbin

September 2016